

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FITOTECNIA

FATORES GENÉTICOS E MOLECULARES ASSOCIADOS AO CARÁTER
ESPIGUETAS MULTIFLORA EM AVEIA

Cristiano Mathias Zimmer
Engenheiro Agrônomo/UFPel

Dissertação apresentada como um dos requisitos
à obtenção do Grau de Mestre em Fitotecnia
Ênfase em Melhoramento e Biotecnologia Vegetal

Porto Alegre (RS), Brasil
Fevereiro de 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Zimmer, Cristiano Mathias
Fatores genéticos e moleculares associados ao
caráter espiguetas multiflora em aveia / Cristiano
Mathias Zimmer. -- 2016.
104 f.

Orientador: Itamar Cristiano Nava.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2016.

1. Aveia nuda. 2. Espiguetas indeterminadas. 3.
APETALA2. 4. Clonagem molecular. I. Nava, Itamar
Cristiano, orient. II. Título.

CRISTIANO MATHIAS ZIMMER
Engenheiro Agrônomo - UFPel

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

MESTRE EM FITOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 18.02.2016
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 17.05.2016
Por

ITAMAR CRISTIANO NAVA
Orientador - PPG Fitotecnia

SIMONE MUNDSTOCK JAHNKE
Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Fitotecnia

MARCELO TEIXEIRA PACHECO
PPG Fitotecnia/UFRGS

LUIZ CARLOS FEDERIZZI
PPG Fitotecnia/UFRGS

MARIA HELENA BODANESE ZANETTINI
PPG Genética e Biologia
Molecular/UFRGS

PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de
Agronomia

Aos meus pais, Alvete M. Zimmer e Ildemar G. Zimmer (*in memoriam*).

Às minhas irmãs, Aline Z. Schneid e Greici M. Zimmer.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

Ao professor Itamar Cristiano Nava, por acreditar no meu trabalho e pela dedicação em orientar-me em todas as etapas deste estudo. Seu comprometimento e preocupação com a formação dos seus alunos são virtudes admiráveis, dignas de muito reconhecimento.

Aos professores do Departamento de Plantas de Lavoura da UFRGS, em especial aos professores Marcelo Teixeira Pacheco e Luiz Carlos Federizzi, pelos ensinamentos e pela convivência na Estação Experimental Agronômica durante o curso de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro e pela concessão da bolsa de estudos.

Aos técnicos do Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura, em especial ao Fábio Berndt, pelo grande auxílio e disposição em ajudar. Aos professores Marcelo Gravina de Moraes e Henrique Bunselmeyer Ferreira, pelo acesso ao Laboratório de Fitopatologia Molecular e ao Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional.

Ao grupo de pesquisa orientado pelo professor Itamar Cristiano Nava, especialmente ao Itacir Ubert, Nicole Barros, Matias Führ e Elisandra Pradella, pelo importante auxílio nas atividades de campo e de laboratório. Agradeço também aos meus colegas do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, pela amizade e parceria.

Aos funcionários da Estação Experimental Agronômica da UFRGS, pelo acompanhamento e suporte nas atividades de campo.

Aos meus pais, Alvetete M. Zimmer e Ildemar G. Zimmer (*in memoriam*), por todos os princípios e ensinamentos de vida.

À minha família, pela confiança, incentivo e compreensão nos momentos em que estive ausente.

À minha namorada, Fernanda Leal, por todo o amor, companheirismo e incentivo incondicional durante a minha formação profissional.

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

A Deus.

FATORES GENÉTICOS E MOLECULARES ASSOCIADOS AO CARÁTER ESPIQUETAS MULTIFLORA EM AVEIA¹

Autor: Cristiano Mathias Zimmer
Orientador: Itamar Cristiano Nava

RESUMO

A formação de espiguetas multiflora é uma característica complexa devido à sua expressividade variável. Os mecanismos genéticos e moleculares que controlam o caráter espiguetas multiflora ainda não são completamente compreendidos em aveia. Os objetivos deste estudo foram: i) caracterizar duas populações de linhagens recombinantes de aveia para o caráter espiguetas multiflora; ii) determinar o número de genes que controla o caráter espiguetas multiflora em aveia e, iii) identificar, clonar, sequenciar e caracterizar sequências codificantes associadas a genes candidatos ao controle da formação de espiguetas multiflora em aveia. As populações de aveia “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1” e “URS Taura x UFRGS 017004-2” foram avaliadas para o caráter espiguetas multiflora, em duas épocas de semeadura, no ano de 2014. A formação de espiguetas normais, multiflora e mosaico, em cada um dos terços da panícula e na panícula inteira foi analisada. Pares de *primers* específicos para o gene *AP2* foram desenvolvidos a partir do alinhamento de sequências homólogas de diferentes espécies de gramíneas. Pares de *primers* para os genes *Vrn1* e *AGL6* também foram utilizados para amplificar e clonar sequências de aveia. A expressão das espiguetas multiflora ao longo da panícula foi alterada nas populações avaliadas em função da época de semeadura. A semeadura tardia aumentou a formação de espiguetas multiflora e reduziu o número de espiguetas mosaico, nas duas populações. A análise genética indicou a presença de um gene maior controlando o caráter espiguetas multiflora em aveia hexaploide. A análise molecular revelou a presença de duas variações alélicas dos genes *Vrn1* e *AP2* nos genótipos URS Taura e UFRGS 017004-2, indicando que o gene *AP2* deve estar conservado em aveia. Uma sequência do gene *AGL6* também foi isolada nestes genitores. A existência de polimorfismos moleculares nos genes *Vrn1*, *AP2* e *AGL6* pode ser determinante para a expressão do caráter espiguetas multiflora. Estudos complementares poderão confirmar a associação destes genes com a formação de espiguetas multiflora em aveia.

¹Dissertação de Mestrado em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (104f.) Fevereiro, 2016.

GENETIC AND MOLECULAR FACTORS ASSOCIATED WITH MULTIFLOROUS SPIKELET TRAIT IN OAT¹

Author: Cristiano Mathias Zimmer
Adviser: Itamar Cristiano Nava

ABSTRACT

The formation of multiflorous spikelet is a complex character due to its variable expressivity. Genetic and molecular mechanisms that control the character multiflorous spikelet are not fully understood in oats. The objectives of this study were: i) to characterize two populations of recombinants oat lines to the character multiflorous spikelet; ii) to determine the number of genes controlling the character multiflorous spikelet in oats; and iii) to identify, clone, sequence and characterize coding sequences associated with candidate genes to control the formation of multiflorous spikelet in oats. The character multiflorous spikelet was evaluated in the oat populations “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1” and “URS Taura x UFRGS 017004-2”, in two sowing dates, in the year of 2014. The formation of normal, multiflorous and mosaic spikelets was analyzed in each third of the panicle and in the whole panicle. Specific primer pairs for the gene *AP2* were developed from the alignment of homologous sequences from different grass species. Specific primer pairs for the genes *Vrn1* and *AGL6* were also utilized for amplifying and cloning oat sequences. The expression of multiflorous spikelets along the panicle was dependent on the sowing date in each evaluated population. The late sowing increased the formation of multiflorous spikelet and decreased the number of mosaic spikelets, in both populations. Genetic analysis indicated the presence of one major gene controlling the character multiflorous spikelet in hexaploid oat. Molecular analysis revealed the presence of two allelic variants of the genes *Vrn1* and *AP2* in the genotypes URS Taura and UFRGS 017004-2, indicating that *AP2* might be conserved in oats. One sequence of the gene *AGL6* was also isolated in these genotypes. The existence of molecular polymorphisms in the genes *Vrn1*, *AP2* and *AGL6* can be crucial for the expression of the character multiflorous spikelet. Further studies may confirm the association of these genes with the formation of multiflorous spikelets in oats.

¹Master thesis in Agronomy, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (104f.) February, 2016.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Introdução	3
2.2 Ocorrência de espiguetas multiflora em aveia e em outros cereais	4
2.3 Evolução do caráter espiguetas multiflora em aveia	6
2.4 Mecanismos genéticos do caráter espiguetas multiflora	9
2.5 Expressividade variável do caráter espiguetas multiflora	10
2.6 Genes do modelo “ABCDE”	12
2.7 Ação dos genes <i>Vrn1</i> , <i>AP2</i> e <i>AGL6</i> na determinação da estrutura floral em gramíneas	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 Análise fenotípica do caráter espiguetas multiflora em aveia	16
3.1.1 Material vegetal	16
3.1.2 Condução dos experimentos em condições de campo	17
3.1.3 Dados meteorológicos	18
3.1.4 Avaliação do caráter espiguetas multiflora	19
3.1.5 Análises estatísticas	20
3.2 Análise genética do caráter espiguetas multiflora em aveia	22
3.2.1 Hipótese genética	22
3.2.2 Teste de qui-quadrado (χ^2)	22
3.3 Análise molecular do caráter espiguetas multiflora em aveia	23
3.3.1 Ortologia do gene <i>AP2</i> em gramíneas	23
3.3.2 Alinhamento múltiplo de sequências e desenho de <i>primers</i>	24
3.3.3 Isolamento e purificação do DNA	26
3.3.4 Amplificação dos genes <i>Vrn1</i> , <i>AP2</i> e <i>AGL6</i> em aveia	27
3.3.5 Clonagem e sequenciamento	28
3.3.5.1 Excisão e reamplificação dos fragmentos de interesse	28
3.3.5.2 Preparo de células competentes	28
3.3.5.3 Reações de ligação e transformação de células competentes	29
3.3.5.4 Multiplicação das células transformadas	30
3.3.5.5 Seleção de clones, multiplicação e purificação dos plasmídeos	31
3.3.5.6 Amplificação dos insertos e preparo de amostras para o sequenciamento	32

3.3.6 Análise <i>in silico</i> dos fragmentos clonados	32
4 RESULTADOS.....	35
4.1 Análise fenotípica do caráter espiguetas multiflora em aveia	35
4.1.1 Dados meteorológicos	35
4.1.2 Análise dos dados fenotípicos.....	36
4.1.2.1 Distribuição de frequências.....	36
4.1.2.2 Análises de variância	44
4.1.2.3 Comparação de médias	49
4.1.2.4 Análise de regressão da expressão do caráter espiguetas multiflora entre as duas épocas de semeadura.....	51
4.2 Análise genética do caráter espiguetas multiflora em aveia	54
4.2.1 População “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1”	55
4.2.2 População “URS Taura x UFRGS 017004-2”	56
4.3 Análise molecular do caráter espiguetas multiflora em aveia	57
4.3.1 <i>Vernalization1</i>	58
4.3.2 <i>APETALA2</i>	60
4.3.3 <i>AGAMOUS-LIKE6</i>	66
5 DISCUSSÃO	69
6 CONCLUSÕES	82
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

1. Genealogia e morfologia de espiguetas dos genitores que deram origem às populações de linhagens avaliadas. 16
2. Sequência e orientação dos pares de *primers* utilizados na amplificação dos genes *Vrn1*, *AP2* e *AGL6* nos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2. 25
3. Resumo da análise de variância para os fenótipos espiguetas normais (ENTi), espiguetas multiflora (EMTi) e espiguetas mosaico (EMSTi) no terço inferior; espiguetas normais (ENTm), espiguetas multiflora (EMTm) e espiguetas mosaico (EMSTm) no terço médio; espiguetas normais (ENTs), espiguetas multiflora (EMTs) e espiguetas mosaico (EMSTs) no terço superior, em duas épocas de semeadura, na população UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1. 45
4. Resumo da análise de variância para os fenótipos espiguetas normais (ENOR), espiguetas multiflora (EMULT) e espiguetas mosaico (EMOS), em duas épocas de semeadura, para a população UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1. 46
5. Resumo da análise de variância para os fenótipos espiguetas normais (ENTi), espiguetas multiflora (EMTi) e espiguetas mosaico (EMSTi) no terço inferior; espiguetas normais (ENTm), espiguetas multiflora (EMTm) e espiguetas mosaico (EMSTm) no terço médio; espiguetas normais (ENTs), espiguetas multiflora (EMTs) e espiguetas mosaico (EMSTs) no terço superior, em duas épocas de semeadura, na população URS Taura x UFRGS 017004-2. 47
6. Resumo da análise de variância para os fenótipos espiguetas normais (ENOR), espiguetas multiflora (EMULT) e espiguetas mosaico (EMOS), em duas épocas de semeadura, para a população URS Taura x UFRGS 017004-2. 48

7. Comparação de médias dos genitores UFRGS 01B7114-1-3 e UFRGS 006013-1, entre as épocas de semeadura, para os fenótipos espiguetas normais (ENTi), espiguetas multiflora (EMTi) e espiguetas mosaico (EMSTi) no terço inferior; espiguetas normais (ENTm), espiguetas multiflora (EMTm) e espiguetas mosaico (EMSTm) no terço médio; espiguetas normais (ENTs), espiguetas multiflora (EMTs) e espiguetas mosaico (EMSTs) no terço superior; espiguetas normais (ENOR), espiguetas multiflora (EMULT) e espiguetas mosaico (EMOS) em toda a panícula.49
8. Comparação de médias entre os genitores URS Taura e UFRGS 017004-2, entre as épocas de semeadura, para os fenótipos espiguetas normais (ENTi), espiguetas multiflora (EMTi) e espiguetas mosaico (EMSTi) no terço inferior; espiguetas normais (ENTm), espiguetas multiflora (EMTm) e espiguetas mosaico (EMSTm) no terço médio; espiguetas normais (ENTs), espiguetas multiflora (EMTs) e espiguetas mosaico (EMSTs) no terço superior; espiguetas normais (ENOR), espiguetas multiflora (EMULT) e espiguetas mosaico (EMOS) em toda a panícula.51
9. Teste de qui-quadrado (χ^2) das proporções fenotípicas observadas e esperadas na população “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1”, em duas épocas de semeadura, considerando o modelo de um gene controlando o carácter espiguetas multiflora em aveia.55
10. Teste de qui-quadrado (χ^2) das proporções fenotípicas observadas e esperadas na população “URS Taura x UFRGS 017004-2”, em duas épocas de semeadura, considerando o modelo de um gene controlando o carácter espiguetas multiflora em aveia.56

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

1. Modelo hipotético do desenvolvimento de panículas em aveia. MA = meristema apical; MP = meristema da panícula; MRP e MRS = meristema das ramificações primárias e secundárias, respectivamente; ME = meristema da espiguetas e MF = meristema floral. Adaptado de Ciaffi *et al.* (2011).5
2. Evolução da aveia cultivada, proposta por Loskutov (2008), indicando o número de flósculos por espiguetas em cada espécie ancestral e cultivada. Imagens: Baum *et al.* (1973), Ladizinsky (2012) e *Virtual Cereal Cultivar Garden* (disponível em <http://www.sortengarten.ethz.ch>).7
3. Diferentes tipos de panículas em aveia. Panículas com espiguetas normais (A) e panículas com espiguetas multiflora e mosaico (B). Ti = terço inferior; Tm = terço médio e Ts = terço superior.19
4. Estrutura do gene *AP2* em *Brachypodium distachyon* com as combinações de *primers* ancoradas em regiões exônicas distintas do gene. Barras em preto indicam os éxons.25
5. Precipitação pluviométrica, temperatura máxima diária e temperatura mínima diária da semeadura até a maturidade fisiológica. A temperatura mínima média durante o período vegetativo foi de 11,6°C para ambas as épocas de semeadura. A temperatura máxima média durante o período vegetativo foi de 21,5°C e 22,3°C para as épocas 1 e 2, respectivamente. A precipitação acumulada durante o período vegetativo foi de 451 mm para a época 1 e 310 mm para a época 2. EEp1 = emergência da época 1; EEp2 = emergência da época 2; FEp1 = início do florescimento na época 1; FEp2 = início do florescimento na época 2. Fonte: INMET.36
6. Distribuição de frequências das linhagens de aveia derivadas do cruzamento UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1 para fenótipos relacionados com o caráter espiguetas multiflora, em duas épocas de semeadura, avaliadas no ano de 2014. As flechas indicam as classes em que se encontram os genitores em cada época de semeadura. E1 = época 1 e E2 = época 2.38
7. Distribuição de frequências das linhagens de aveia derivadas do cruzamento UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1 para os fenótipos espiguetas normais, multiflora e mosaico, em duas épocas de semeadura, avaliadas no ano de 2014. As flechas indicam as classes em que se encontram os genitores em cada época de semeadura. E1 = época 1 e E2 = época 2.40

8. Distribuição de frequências das linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento entre URS Taura x UFRGS 017004-2 para fenótipos relacionados com o caráter espiguetas multiflora, em duas épocas de semeadura, no ano de 2014. As flechas indicam as classes que se encontram os genitores em cada época de semeadura. E1 = época 1 e E2 = época 2.41
9. Distribuição de frequências das linhagens de aveia derivadas do cruzamento URS Taura x UFRGS 017004-2 para os fenótipos espiguetas normais, multiflora e mosaico, em duas épocas de semeadura, no ano de 2014. As flechas indicam as classes em que se encontram os genitores em cada época de semeadura. E1 = época 1 e E2 = época 2.....43
10. Regressão linear para espiguetas multiflora no terço inferior – EMTi (A), terço médio – EMTm (B) e terço superior – EMTs (C) em função da época de semeadura, na população UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1. Legenda: pontos pretos = linhagens recombinantes; ponto maior de coloração azul = UFRGS 01B7114-1-3; ponto maior de coloração vermelha = UFRGS 006013-1.52
11. Regressão linear para espiguetas multiflora no terço inferior – EMTi (A), terço médio – EMTm (B) e terço superior – EMTs (C) em função da época de semeadura, na população URS Taura x UFRGS 017004-2. Legenda: pontos pretos = linhagens recombinantes; ponto maior de coloração azul = URS Taura; ponto maior de coloração vermelha = UFRGS 017004-2.....54
12. Alinhamento da região que corresponde do terceiro ao quinto éxon (caixas em vermelho) do gene *Vrn1*, amplificada pelo par de *primers* Ver-1.18. Regiões marcadas em preto indicam conservação entre as sequências. Legenda: U01a (Sequência “a” do genitor UFRGS 017004-2); U01b (Sequência “b” do genitor UFRGS 017004-2); UTAA (Sequência “a” do genitor URS Taura); UTAb (Sequência “b” do genitor URS Taura) e Trigo (*Triticum aestivum* L., acesso AY747600.1).....58
13. Alinhamento das sequências de aminoácidos correspondente ao quarto éxon do gene *Vrn1* amplificadas pelo par de *primers* Ver-1.18. Legenda: U01b (sequência “b” de UFRGS 017004-2); UTAb (sequência “b” de URS Taura) e Trigo (acesso AY747600.1).60
14. Alinhamento da região que corresponde do quinto ao oitavo éxon do gene *AP2* de *Brachypodium distachyon* (marcado em vermelho) e as sequências “x” dos genitores, amplificadas pelo par de *primers* Ap2.7. Regiões marcadas em preto indicam conservação entre as três sequências alinhadas. Regiões marcadas em cinza indicam conservação entre as sequências dos genitores. Legenda: U01x (sequência “x” do genitor UFRGS 017004-2); UTAx (sequência “x” do genitor URS Taura) e B. distac (*Brachypodium distachyon*, acesso XM_010233483.1).61

15. Alinhamento de sequências de aveia (convertidas para RNA mensageiro), amplificadas pelo par de primers Ap2.7, e do *miR172a* de *Brachypodium distachyon* (acesso MI0018110). Regiões marcadas em preto indicam conservação entre as sequências dos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2 e a sequência transcrita do gene *miR172a*. Regiões marcadas em cinza indicam conservação entre as sequências de aveia. A região identificada em verde representa uma possível ORF (*Open Reading Frame*). A região identificada em vermelho indica um códon de terminação (UGA, Opala) prematuro na sequência do genitor UFRGS 017004-2. A região em azul representa o sítio de pareamento do *miR172a* em *Brachypodium distachyon* (em uma região exônica).62

16. Alinhamento das sequências de aminoácidos correspondente à possível proteína codificada pelo gene *AP2* em aveia. Regiões marcadas em preto indicam conservação entre as sequências de aminoácidos. A presença do asterisco entre os aminoácidos R e V indicou a existência de um códon de terminação.63

17. Estrutura tridimensional (3D) da possível proteína codificada pelo gene *AP2* nos genitores URS Taura (espiguetas normais) e UFRGS 017004-2 (espiguetas multiflora). A esfera cinza na estrutura do genitor URS Taura representa um íon de Ca^{+2} 64

18. Alinhamento das sequências “y” de aveia, amplificadas pelo par de primers Ap2.7, *Brachypodium distachyon* (acesso XM_010233483.1), cevada (acesso AK370055.1) e trigo (acesso AJ577368.1). Regiões marcadas em preto e em cinza indicam conservação entre as sequências. Legenda: U01y (sequência “y” do genitor UFRGS 017004-2), UTAY (sequência “y” do genitor URS Taura) e B.distac (*Brachypodium distachyon*).65

19. Alinhamento de sequências amplificadas neste estudo pelo par de primers AGL6 entre as espécies: aveia branca (A.sat, acesso GQ496645.1), aveia preta (A.str, acesso GQ496644.1), *Brachypodium distachyon* (B.dis, acesso GQ496641.1), *Triticum monococcum* (T.mon, acesso GQ496643.1), cevada (acessos GQ496642.1) e *Lolium temulentum* (L.tem, acesso GQ496646.1). Regiões marcadas em preto e em cinza indicam conservação entre as sequências. Legenda: U01 = sequência do genitor UFRGS 017004-2 e UTA = sequência do genitor URS Taura.67

20. Alinhamento da sequência de aminoácidos codificada pelo gene *AGL6* nos genótipos URS Taura e UFRGS 017004-2 com a sequência completa de aminoácidos do gene *AGL6* de cevada (acesso AY541067.1). Regiões marcadas em preto indicaram similaridade entre as sequências de aminoácidos. A presença do asterisco entre os aminoácidos indica a existência de códons de terminação.68

1 INTRODUÇÃO

A aveia (*Avena sativa* L.) apresenta propriedades nutricionais adequadas ao consumo humano, como a qualidade das proteínas, o conteúdo de fibras solúveis e o predomínio de ácidos graxos insaturados. Estes atributos fazem com que a aveia seja reconhecida como um alimento funcional. O melhoramento genético da aveia no Brasil ainda é considerado recente quando comparado com outros cereais, tendo início na década de 1970. Desde então, grande esforço tem sido realizado para desenvolver cultivares adaptadas às condições brasileiras de cultivo. Além disso, a compreensão de características importantes para a cultura, como a resistência às moléstias, tolerância ao acamamento, qualidade industrial, formação de grãos nus e de espiguetas multiflora também tem sido investigado pelos programas de melhoramento genético.

A ocorrência de espiguetas multiflora em aveia, que são caracterizadas por apresentar de quatro a 12 flósculos férteis por espiguetas, ainda não está completamente elucidada. Esta característica está fenotipicamente associada com o caráter nuda, ou seja, grãos sem casca quando trilhados. Um dos principais fatores que limita o entendimento do caráter espiguetas multiflora em aveia é a sua expressividade variável. Devido a isso, a manifestação fenotípica deste caráter não é uniforme entre indivíduos que possuem um mesmo genótipo, podendo variar entre plantas, entre panículas de uma mesma planta e dentro de uma mesma panícula. As causas da expressividade variável do caráter

espiguetas multiflora ainda não foram elucidadas. Possivelmente, fatores epigenéticos, como microRNAs, e ambientais, como temperatura e fotoperíodo, devem regular a expressão de genes que controlam este caráter.

Estudos em mutantes de *Arabidopsis thaliana* e *Antirrhinum majus* permitiram a construção de um modelo de florescimento (modelo “ABCDE”), onde diversos genes atuam de forma isolada e/ou conjunta na determinação das estruturas florais. A identificação destes genes e a compreensão dos seus mecanismos de ação foram determinantes para elucidar a formação das estruturas florais em espécies modelo. Aplicar estes conhecimentos em gramíneas pode ser determinante para elucidar características importantes, relacionadas com a formação das inflorescências, incluindo a formação de espiguetas multiflora.

O desenvolvimento de pesquisas envolvendo a ação dos sinais ambientais sobre a expressão do caráter espiguetas multiflora em aveia, bem como a identificação de fatores genéticos e moleculares que estejam associados a este caráter, serão determinantes para o melhor entendimento desta característica.

Desta forma, os principais objetivos deste trabalho foram:

i) caracterizar fenotipicamente duas populações de linhagens de aveia, oriundas do cruzamento entre genitores contrastantes para o caráter espiguetas multiflora, em duas épocas de semeadura;

ii) determinar o número de genes envolvidos no controle do caráter espiguetas multiflora em duas populações de linhagens de aveia, em duas épocas de semeadura;

iii) identificar, clonar, sequenciar e caracterizar sequências codificantes associadas a genes candidatos ao controle do caráter espiguetas multiflora em aveia, como *Vernalization1*, *APETALA2* e *AGAMOUS-LIKE6*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Introdução

A aveia pertence à família botânica *Poaceae*, subfamília *Poideae*, tribo *Aveneae* e gênero *Avena*. As diferentes espécies de aveia formam uma série poliploide, representada por espécies diploides, tetraploides e hexaploides, com o número básico de cromossomos igual a sete. A aveia branca (*Avena sativa* L.) é uma espécie alohexaploide, apresentando seis conjuntos básicos de cromossomos ($2n = 6x = 42$), formados a partir da agregação de três genomas (AA, CC e DD) de espécies ancestrais diploides (Rajhathy & Thomas, 1974).

O cultivo da aveia é realizado em diversas regiões do mundo, sendo que a adaptação deste cereal ocorre preferencialmente em países de clima frio e úmido e em regiões localizadas entre 35° e 50° de latitude Norte e 20° e 40° de latitude Sul (De Mori *et al.*, 2012). O Brasil tem se mantido entre os três maiores produtores de aveia da América Latina (FAOSTAT, 2016), sendo o Sul do Brasil a principal região produtora. Com uma área total estimada de 177 mil hectares e produtividade média de 2145 kg ha⁻¹ na safra de 2015, a região Sul apresenta os estados do Rio Grande do Sul e Paraná como os principais produtores (CONAB, 2015).

O melhoramento genético de aveia ainda é recente no Brasil, tendo iniciado na década de 1970. A identificação de características agronômicas que atendam a demanda do setor produtivo e a sua incorporação em germoplasma elite são

determinantes para o desenvolvimento de novas cultivares. Entre estas características estão o rendimento, composição e estrutura dos grãos. Estes atributos são determinantes para definir a aptidão industrial de uma cultivar e tem sido um dos principais objetivos dos programas de melhoramento de aveia (Valentine, 1995). Neste sentido, identificar fatores genéticos e moleculares associados com o caráter espiguetas multiflora, bem como compreender a ação do ambiente sobre a expressão deste caráter, será determinante para o progresso genético e exploração comercial da aveia nuda.

2.2 Ocorrência de espiguetas multiflora em aveia e em outros cereais

As angiospermas apresentam arquitetura de inflorescência que varia em tamanho e em morfologia entre as diferentes espécies. As estruturas florais das gramíneas são divididas em subunidades denominadas “espiguetas” que, dependendo da espécie, contém de uma a 40 flores (Schmidt & Ambrose, 1998). A determinação floral ocorre de diferentes formas, de acordo com a espécie, genótipos de uma mesma espécie e condições do ambiente (Ciaffi *et al.*, 2011).

A complexidade das inflorescências em gramíneas é determinada pela ação de diferentes tipos de meristemas, conforme identificado em mutantes de milho, arroz e trigo (Bommert *et al.*, 2005; Kellogg, 2007). Em arroz, o meristema das panículas (MP) produz diversos meristemas de ramificação primária (MRP) que, antes de serem ativados, iniciam meristemas de ramificações secundárias (MRS). Após ativar o MRP, o MP é degenerado e os internódios das ramificações primárias e secundárias alongam para formar a arquitetura da panícula (Ciaffi *et al.*, 2011). Considerando que as inflorescências de arroz e de aveia são organizadas em panículas, pode-se considerar a hipótese de que os meristemas florais destas espécies apresentam o mesmo nível de organização (Figura 1).

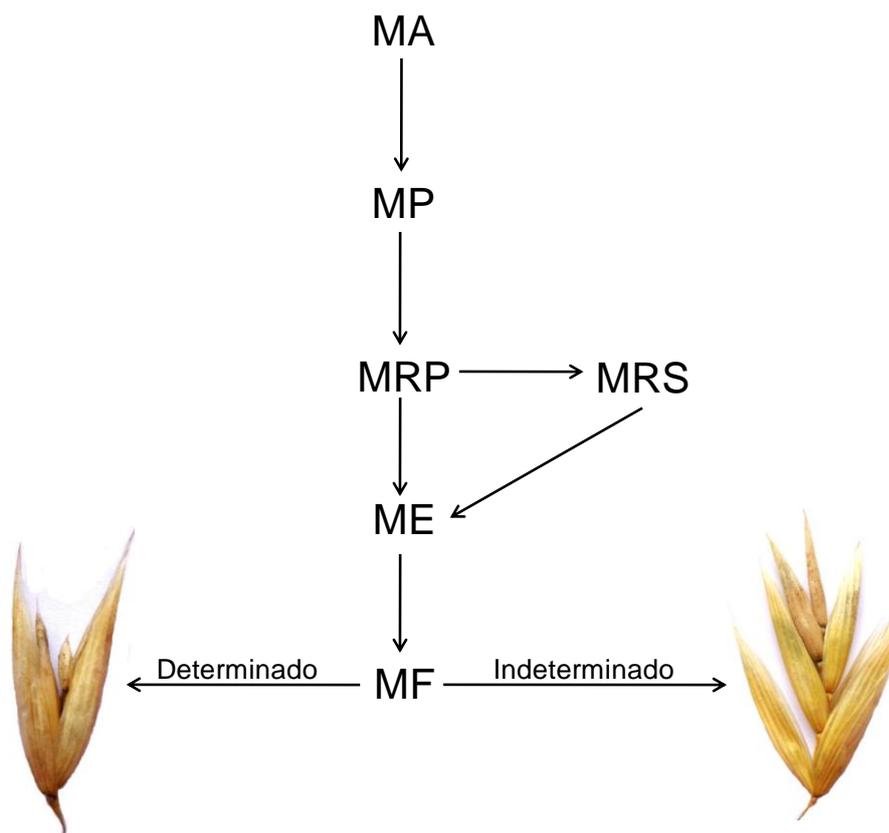


FIGURA 1. Modelo hipotético do desenvolvimento de panículas em aveia. MA = meristema apical; MP = meristema da panícula; MRP e MRS = meristema das ramificações primárias e secundárias, respectivamente; ME = meristema da espiguetas e MF = meristema floral. Adaptado de Ciaffi *et al.* (2011).

A maioria das espécies cultivadas de aveia possui espiguetas normais, com dois ou três flósculos férteis por espiguetas, raramente quatro (Valentine, 1995). A aveia nuda (*Avena sativa* L. subsp. *nudisativa*) possui espiguetas multiflora, caracterizadas pela ráquila alongada e por apresentar de quatro a oito flósculos férteis (Peltonen-Sainio *et al.*, 2004), podendo chegar a até 12 flósculos (Burrows, 1986). A ocorrência de espiguetas multiflora em aveia está associada fenotipicamente com o caráter nuda. A formação de grãos nus em aveia (caráter nuda) é determinada pela pouca lignificação da lema, concentrando-se basicamente próximo aos feixes vasculares, tornando-a menos espessa e rígida, favorecendo o processo de trilha (Ougham *et al.*, 1996).

A formação de espiguetas/inflorescências indeterminadas já foi relatada em diversas espécies de interesse agrícola, como cevada (Brown & Bregitzer, 2011; Poursarebani *et al.*, 2015), trigo (Poursarebani *et al.*, 2015), arroz (Lee *et al.*, 2007) e milho (Chuck *et al.*, 1998; Chuck *et al.*, 2007a; Chuck *et al.*, 2008). Em trigo, diferentemente da aveia, a formação de espiguetas indeterminadas é mais pronunciada na parte inferior da inflorescência.

2.3 Evolução do caráter espiguetas multiflora em aveia

A característica espiguetas multiflora pode ser identificada em outras espécies do gênero *Avena*, como *Avena clauda* (genoma CC, três a cinco flósculos por espiguetas), *Avena magna* (genoma AACCC, dois a quatro flósculos por espiguetas), *Avena murphyi* (genoma AACCC, dois a quatro flósculos por espiguetas) e *Avena sterilis* (genoma AACCCDD, três a cinco flósculos por espiguetas) (Ladizinsky, 2012).

A espécie *Avena magna*, que é um dos prováveis ancestrais tetraploides das espécies hexaploides de aveia, foi formada a partir do cruzamento entre as espécies diploides *Avena ventricosa* (genoma CC) e *Avena canariensis* (genoma AA) (Rajhathy & Thomas, 1974), que possuem apenas dois flósculos por espiguetas (Ladizinsky, 2012). Posteriormente, a espécie *Avena magna* cruzou com *Avena insularis* (genoma CCDD), a qual possui de dois a três flósculos por espiguetas. A *Avena insularis* é a possível doadora do subgenoma “D”, presente nas aveias hexaploides. Este cruzamento deu origem à espécie *Avena sterilis* (genoma AACCCDD, com dois a cinco flósculos por espiguetas) (Loskutov, 2008; Ladizinsky, 2012). Esta espécie é o provável progenitor ancestral das espécies hexaploides de aveia, incluindo *Avena sativa* L. e *Avena sativa* L. subsp. *nudisativa* (Figura 2) (Coffman, 1977).

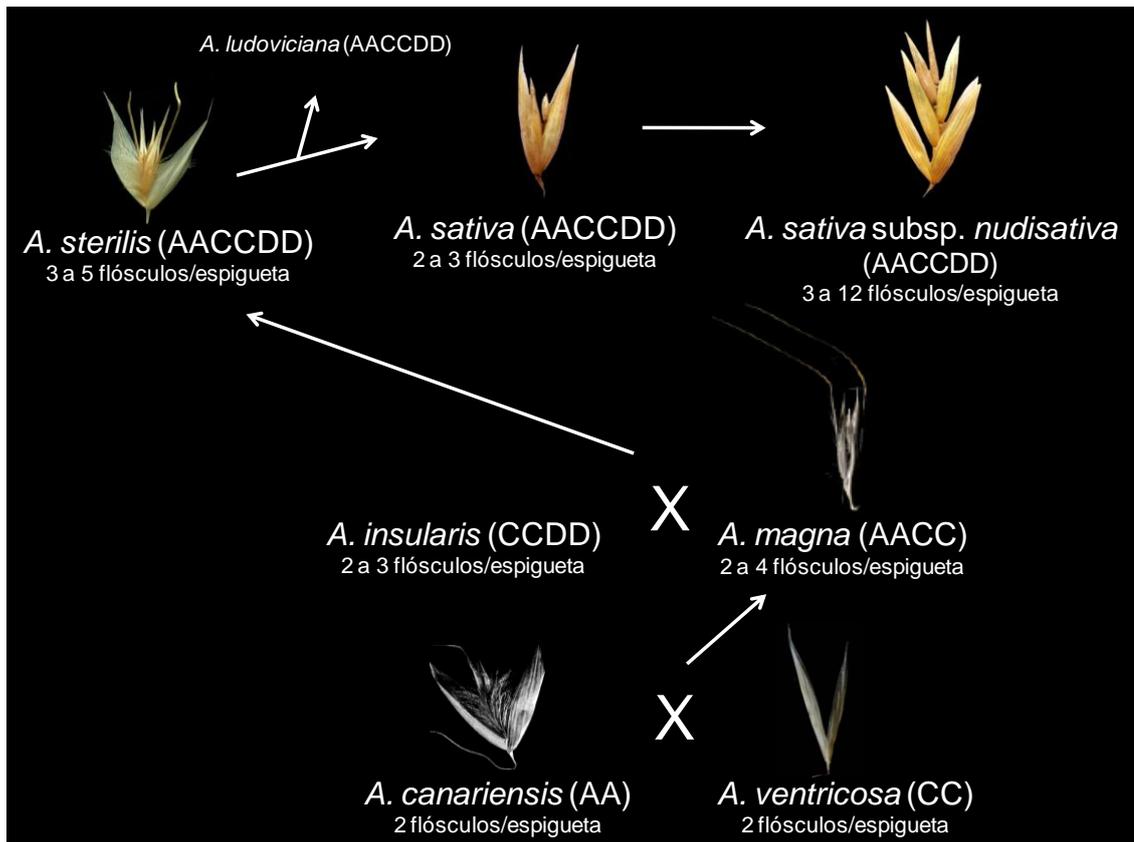


FIGURA 2. Evolução da aveia cultivada, proposta por Loskutov (2008), indicando o número de flósculos por espiguetas em cada espécie ancestral e cultivada. Imagens: Baum *et al.* (1973), Ladizinsky (2012) e *Virtual Cereal Cultivar Garden* (disponível em <http://www.sortengarten.ethz.ch>).

A ocorrência de mutações em espécies ancestrais como *Avena sterilis*, que resultaram na perda da deiscência natural e dormência das sementes, foram fatores evolutivos essenciais para o surgimento da espécie *Avena sativa* L. (Leggett & Thomas, 1995). Estas mutações representaram uma vantagem seletiva, permitindo que a aveia tenha passado do estado silvestre para o cultivado. A aveia nuda apresenta a Mongólia e o noroeste da China como prováveis centros de origem, diferente da *Avena sativa* L. que apresenta a região da Ásia Menor como provável centro de origem (Loskutov, 2008). Existem indícios que revelam que a aveia nuda é explorada na China desde os anos 500 D.C. (Vavilov, 1992), indicando que esta subespécie foi isolada geograficamente por um longo período, o que justifica as suas diferenças morfológicas.

Observando o processo evolutivo da aveia proposto por Loskutov (2008), verifica-se que nenhuma espécie diploide ou tetraploide, que possui os genomas AA ou AABB, apresenta espiguetas multiflora (Ladizinsky, 2012). No entanto, a espécie diploide *Avena clauda*, que evoluiu a partir da espécie *Avena pilosa* e possui o genoma CC, apresenta de três a cinco flósculos por espiguetas (Loskutov, 2008; Ladizinsky, 2012).

Os eventos de poliploidia parecem estar associados com a ocorrência de espiguetas multiflora em aveia. A espécie tetraploide *Avena magna* apresenta até quatro flósculos por espiguetas (Ladizinsky, 2012). Além disso, a espécie hexaploide *Avena sterilis*, que teve origem a partir do cruzamento entre *Avena magna* e *Avena insularis* (Loskutov, 2008), possui até cinco flósculos por espiguetas (Ladizinsky, 2012). Possivelmente, as diferentes combinações alélicas formadas a partir da junção dos distintos subgenomas estão associadas ao caráter espiguetas multiflora. A ação complementar mútua dos alelos destas espécies pode favorecer a expressão do caráter espiguetas multiflora em aveia.

A ocorrência de espiguetas multiflora em aveia pode ter representado grande valor evolutivo, facilitando a sua dispersão como planta invasora entre as sementes de trigo e cevada (Leggett & Thomas, 1995). A formação destas espiguetas (quando férteis) permite a produção de um maior número de descendentes, o que é uma vantagem evolutiva. Por outro lado, devido ao grande número de sementes formadas por uma mesma espiguetas, verifica-se a ocorrência de sementes com conteúdo reduzido de reserva. Além disso, os flósculos superiores das espiguetas multiflora podem apresentar elevada infertilidade (Valentine, 1995). Estes fatores podem ter sido determinantes para que a característica não tenha sido perpetuada ao longo da evolução da espécie.

2.4 Mecanismos genéticos do caráter espiguetas multiflora

O gene *INDETERMINATE SPIKELET1 (IDS1)* de milho, o qual pertence à família de genes *APETALA2 (AP2)*, é determinante para prevenir a formação de flores indeterminadas em ambas as inflorescências. Em mutantes *ids1* o meristema das espiguetas torna-se indeterminado, produzindo mais espiguetas que em plantas silvestres (Chuck *et al.*, 1998). Um gene parálogo (originado por duplicação) de *IDS1*, denominado *SISTER OF INDETERMINATE SPIKELET1 (SID1)*, também foi identificado em milho. Os genes *IDS1* e *SID1* interagem de forma epistática e definem a determinação de vários meristemas laterais nas inflorescências (Chuck *et al.*, 2008). Além dos genes descritos anteriormente, o gene *BRANCHED SILKLESS1 (BD1)* também atua sobre a formação das inflorescências de milho. Em mutantes *bd1* foi verificada a ocorrência de ramificações indeterminadas nas espigas (Veit *et al.*, 1993).

Em arroz, os genes *Os03g60430* (recentemente nomeado de *Oryza sativa INDETERMINATE SPIKELET1, OsIDS1*) e *SUPERNUMERARY BRACT (SNB)* são ortólogos aos genes *IDS1* e *SID1* de milho, respectivamente (Chuck *et al.*, 2008; Lee & An, 2012). Estes genes são determinantes para a arquitetura das panículas e para o estabelecimento dos meristemas florais (Lee & An, 2012). Mutantes de arroz com perda de função do gene *snb* atrasaram a transição do meristema das espiguetas e produziram glumas extras antes da iniciação floral. Além disso, algumas espiguetas transformaram glumas e lodículas em estruturas similares com a lema e a pálea (Lee *et al.*, 2007).

Em duplos mutantes *ids1* e *snb* de arroz, o número de ramificações e espiguetas nas panículas foi reduzido, sendo que a transição do meristema floral foi ainda mais tardia quando comparada ao mutante simples *snb* (Lee & An, 2012). O gene *FRIZZY PANICLE (FZP)*, ortólogo do gene *BD1* de milho, regula a

identidade do meristema das espiguetas em arroz (Chuck *et al.*, 2002; Komatsu *et al.*, 2003).

O gene *compositum2* (*com2*), isolado e clonado em genótipos de cevada com espiguetas indeterminadas, apresenta ortologia ao gene *branched head^f* (*bh^f*) (Poursarebani *et al.*, 2015), que determina a formação de várias espiguetas em cada nó da ráquis em trigo (Klindworth *et al.*, 1997). Ambos são considerados ortólogos ao gene *BD1* de milho e aos genes *FZP* e *BRANCHED FLORETLESS1* (*BFL1*) de arroz, que codificam fatores de transcrição da família AP2/ERF (*Ethylene Responsive Factor*). Estes fatores de transcrição também estão associados com a resposta a estresses (Mizoi *et al.*, 2012).

Por muito tempo acreditou-se que os caracteres espiguetas multiflora e grãos nus em aveia fossem governados pelo gene *Naked-1* (*N-1*) (Simons *et al.*, 1978; Ougham *et al.*, 1996). Apenas um trabalho propôs que os caracteres nuda e multiflora são governados por dois locos gênicos distintos (Kibite & Taylor, 1994). O gene *Multiflorous-1* (*Mf-1*), com ação gênica de dominância parcial, foi proposto para o controle da formação de espiguetas multiflora em aveia (Kibite & Taylor, 1994). Neste mesmo trabalho, os autores relataram que os dados de segregação conjunta para os genes *N-1* e *Mf-1* indicaram uma frequência de recombinação extremamente baixa, o que justifica que a maioria dos genótipos com espiguetas multiflora apresentem grãos nus. No entanto, os mecanismos genéticos e moleculares que envolvem o caráter espiguetas multiflora ainda não foram elucidados em aveia.

2.5 Expressividade variável do caráter espiguetas multiflora

O termo expressividade variável é atribuído quando indivíduos que possuem uma constituição genotípica ou alélica apropriada para expressar uma

característica de maneira uniforme, apresentam expressão desuniforme devido a outros fatores (Snustad & Simmons, 2012). Parte desta modulação entre o genótipo e o fenótipo se deve a fatores ambientais, mas parte também deve estar associada a outros fatores genéticos e/ou epigenéticos.

Grande parte dos genes da família AP2 são regulados de forma pós-transcricional pelo *microRNA172* (*miR172*). O *miR172* é sintetizado a partir da transcrição de um segmento de DNA, situado em um ou mais locos gênicos (dependendo da espécie), pela ação da RNA polimerase II. Após ser clivado, este pequeno RNA não codificante, de aproximadamente 21 nucleotídeos, atua na repressão da tradução dos transcritos do gene *AP2* (Chen, 2004).

Em milho, o *miR172* é transcrito a partir do gene *TASSELSEED4* (*TS4*) e atua na regulação dos genes *IDS1* e *SID1*. Mutantes *ts4* produziram espiguetas com meristema indeterminado (Chuck *et al.*, 2007b). Em arroz, os níveis de RNA mensageiro dos genes *OsIDS1* e *SNB* foram significativamente reduzidos em plantas que superexpressavam o *miR172*, quando comparadas com plantas silvestres (Lee & An, 2012). A superexpressão do *miR172* em arroz atrasou a transição do meristema das espiguetas para o meristema floral, ocasionando defeitos nas inflorescências e no desenvolvimento das sementes, bem como a alteração do número e identidade dos órgãos florais (Zhu *et al.*, 2009).

A expressão do *miR172* é regulada em grande parte pelas condições ambientais, como o comprimento do dia e a temperatura (Jung *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010). No entanto, a interação com outros microRNAs, como o *miR156* já foram descritas na literatura (Chuck *et al.*, 2007b; Wu *et al.*, 2009). Sob condições de fotoperíodo de dias curtos a expressão do gene *miR172* foi muito baixa, enquanto que nas condições de fotoperíodo de dias longos verificou-se elevados níveis de expressão gênica (Jung *et al.*, 2007).

2.6 Genes do modelo “ABCDE”

Estudos genéticos e moleculares permitiram a identificação de vários genes que apresentam grande importância na regulação da arquitetura das inflorescências, no desenvolvimento e na identificação dos órgãos florais em plantas superiores (Bommert *et al.*, 2005; Doust, 2007; Thompson & Hake, 2009). Estes conhecimentos permitiram a elaboração de um quadro comparativo entre espécies modelo e espécies de grande importância agrônômica, como os cereais.

A elaboração do modelo ABC de desenvolvimento floral, baseado em mutantes de *Arabidopsis thaliana* e *Antirrhinum majus*, foi um dos avanços mais significativos para a biologia vegetal (Coen & Meyerowitz, 1991). A ação de três classes de genes (“A”, “B” e “C”) determina a formação de sépalas, pétalas, estames e carpelos, formando uma estrutura floral concêntrica (Ciaffi *et al.*, 2011). Recentemente, as classes “D” e “E” foram adicionadas ao modelo. A classe “D” está relacionada com o desenvolvimento dos óvulos, enquanto a classe “E” está associada com a formação de sépalas, pétalas, estames, carpelos e óvulos (Theissen, 2001).

Os genes *APETALA1* (*AP1*) e *AP2* representam a classe “A” em *Arabidopsis*. A classe “B” é representada pelos genes *APETALA3* (*AP3*) e *PISTILLATA* (*PI*), enquanto a classe “C” é composta apenas pelo gene *AGAMOUS* (*AG*) (Causier *et al.*, 2010). Com exceção do gene *AP2*, todos os demais genes do modelo ABCDE que foram estudados até o momento codificam fatores de transcrição *MADS-box* do tipo *MIKC* (*M-Mads*, *I-intervening*, *K-keratin-like* e *C-terminal*) (Theissen *et al.*, 1996).

Os fatores de transcrição *MADS-box* estão envolvidos em uma série de eventos determinantes para o desenvolvimento das plantas (Becker & Theissen, 2003). A duplicação e a diversificação destes genes pode ter desempenhado um

papel importante na evolução de inflorescências complexas em gramíneas e na alteração da rede regulatória que determina as estruturas florais (Zahn *et al.*, 2005; Litt & Kramer, 2010; Ciaffi *et al.*, 2011).

2.7 Ação dos genes *Vrn1*, *AP2* e *AGL6* na determinação da estrutura floral em gramíneas

O gene *AP1* de *Arabidopsis* apresenta elevada similaridade de nucleotídeos aos genes homeólogos de trigo cultivado *Vrn1-A1*, *Vrn1-B1* e *Vrn1-D1* (Fu *et al.*, 2005), e ao gene *Vrn1* da espécie diplóide *Triticum monococcum* (Yan *et al.*, 2003). Da mesma forma que em trigo, o gene *Vrn1-H1* foi identificado e mapeado em cevada (Von Zitzewitz *et al.*, 2005). Regiões codificantes do gene *Vrn1* também foram identificadas e caracterizadas em aveia, indicando a sua provável conservação entre os cereais (Nava *et al.*, 2012). Duas funções principais foram atribuídas ao gene *AP1*: i) identidade de sépalas e pétalas e, ii) especificação da identidade do meristema floral (Mandel *et al.*, 1992). Acredita-se que a primeira função do gene *AP1* foi a especificação da identidade do meristema floral ou a alteração para a fase reprodutiva, enquanto que a sua função sobre a especificação de sépalas e pétalas foi adquirida posteriormente (Theissen *et al.*, 2000; Shan *et al.*, 2007).

As mutações *ap1-1* e *ap2-1* de *Arabidopsis* interagem sinergicamente e, quando são duplamente recessivas, promovem o desenvolvimento de inflorescências axilares (Irish & Sussex, 1990). O aumento da atividade do gene *AG* em mutantes *ap2-1* de *Arabidopsis* promove o desenvolvimento de órgãos florais periféricos. Mutantes *ag* apresentaram modificações dos órgãos do perianto, indicando uma expansão das funções dos genes da classe “A” para o centro da flor (Wollmann *et al.*, 2010). Em condições de fotoperíodo de dias

curtos, mutantes *ap2-3* ou *ap2-4* de *Arabidopsis* também desenvolveram flores axilares (Komaki *et al.*, 1988).

A expressão do gene *AP2* pode alterar a formação dos órgãos florais, sendo sua atividade mediada, em parte, pelo gene *WUSCHEL* (*WUS*) (Chen, 2004; Zhao *et al.*, 2007). O gene *WUS* é um co-ativador do gene *AG* durante os estádios iniciais de desenvolvimento e, posteriormente, deve ser reprimido pelo próprio gene *AG* para a formação de flores determinadas de *Arabidopsis* (Lenhard *et al.*, 2001; Lohmann *et al.*, 2001).

Em *Arabidopsis*, a classe “E” é representada pelos genes *SEPALLATA* (*SEP*), que codificam proteínas que interagem com os produtos gênicos das classes “A”, “B”, “C” e “D”, formando complexos protéicos *MADS-box* (Favaro *et al.*, 2003). Estes complexos protéicos regulam a formação e a identidade dos órgãos florais. Análises filogenéticas dos genes *MADS-box* e das suas proteínas indicaram que os genes *AGAMOUS-LIKE6* (*AGL6*) são similares aos genes *SEP*, tendo as suas funções atribuídas à classe “E” (Theissen *et al.*, 2000; Zahn *et al.*, 2005).

Mutantes de arroz para o gene *OsMADS6*, identificados como *mosaic floral organs* (*mfo1*), um gene da família *AGL6*, indicaram que este gene é um regulador chave na identidade dos órgãos florais e na determinação do meristema floral de arroz (Ohmori *et al.*, 2009). Plantas *mfo1* apresentaram alterações na pálea, lodículas alongadas muito similares às glumas ou órgãos mosaico (intermediários) e desenvolvimento anormal dos carpelos. Além disso, o meristema floral deixou de ser determinado, proporcionando a formação de carpelos e espiguetas extras (Ohmori *et al.*, 2009).

A expressão do gene *TaAGL6* de trigo é similar ao gene *OsMADS6* em arroz. Sua transcrição ocorre nas espigas, espiguetas e cariopses em

desenvolvimento durante o florescimento. Nas espiguetas, a sua expressão é restrita na pálea, lodículas e pistilos. Estes resultados indicam que o gene *TaAGL6* de trigo, assim como o seu ortólogo *OsMADS6* de arroz, pode ser determinante para a especificação da identidade e/ou para o desenvolvimento dos órgãos florais (Ciaffi *et al.*, 2011).

Desta forma, a identificação de genes candidatos ao controle do caráter espiguetas multiflora em aveia, como *Vrn1*, *AP2* e *AGL6*, será determinante para avançar o entendimento de como este caráter é controlado. Além disso, verificar a ação dos sinais ambientais, sobre estes genes e sobre outros fatores genéticos, poderá elucidar a expressividade variável do caráter espiguetas multiflora em aveia.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise fenotípica do caráter espiguetas multiflora em aveia

3.1.1 Material vegetal

Duas populações de linhagens recombinantes de aveia hexaploide foram analisadas neste estudo. As populações foram derivadas do cruzamento simples entre os genitores “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1” e “URS Taura x UFRGS 017004-2”. Os genitores foram desenvolvidos pelo Programa de Melhoramento Genético de Aveia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A escolha destes genitores para o desenvolvimento das populações de linhagens considerou o contraste entre eles para o caráter espiguetas multiflora (Tabela 1).

TABELA 1. Genealogia e morfologia de espiguetas dos genitores que deram origem às populações de linhagens avaliadas.

Pop.	Genitores	Genealogia	Espiguetas
I	UFRGS 01B7114-1-3	(Pc68/5*Starter F ₄) x UFRGS 10	Normal
	UFRGS 006013-1	(Cocker 492/Starter-1 F ₃) x UFRGS 10	Mult/Mos
II	URS Taura	UFRGS 970216-2 x UFRGS 970461	Normal
	UFRGS 017004-2	(Cocker 492/Starter-1 F ₃) x UFRGS 8	Mult/Mos

Pop = população; Mult = multiflora e Mos = mosaico.

Os genitores UFRGS 01B7114-1-3 e URS Taura apresentam panículas com todas as espiguetas normais, com dois ou três flósculos. Por outro lado, os genitores UFRGS 006013-1 e UFRGS 017004-2 apresentam panículas com

espiguetas multiflora, que contém pelo menos quatro flósculos e possuem a ráquila alongada, ou espiguetas mosaico, com número variado de flósculos, contendo grãos com e sem casca em uma mesma espiguetas. Os cruzamentos foram realizados no ano de 2008, sendo que no ano de 2009 as sementes da primeira geração filial (F_1) derivadas destes cruzamentos foram semeadas no campo para a obtenção de sementes F_2 . Da geração F_2 até a geração F_5 , as plantas foram conduzidas pelo método SSD (*Single-Seed Descent*) modificado, sem seleção, com o objetivo de manter a variabilidade genética até as gerações avançadas. Panículas individuais foram coletadas a partir de plantas da geração F_5 , dando origem a sementes da geração $F_{5:6}$.

3.1.2 Condução dos experimentos em condições de campo

Os experimentos foram conduzidos na Estação Experimental Agronômica (EEA), pertencente à UFRGS, localizada no município de Eldorado do Sul, RS. A EEA está situada na região da Depressão Central, na latitude de 30° Sul e na longitude de 51° Oeste. A área apresenta relevo de ondulado a suavemente ondulado. Os solos situam-se em duas unidades de mapeamento predominantes: São Jerônimo, com argissolos vermelhos distróficos e Arroio dos Ratos, com argissolos distróficos típicos (Streck *et al.*, 2008).

Um total de 182 linhagens na geração $F_{5:7}$, sendo 92 linhagens da população “UFRGS 01B7114-13 x UFRGS 006013-1” e 90 linhagens da população “URS Taura x UFRGS 017004-2”, e seus respectivos genitores foram avaliados no ano de 2014, em duas épocas de semeadura. A semeadura da primeira época foi realizada no dia 12 de junho, enquanto a segunda época de semeadura foi realizada no dia 04 de julho. O delineamento experimental utilizado foi de blocos ao acaso, com duas repetições. Cada unidade experimental foi

constituída por uma cova, com espaçamento de 0,30 m entre si. A semeadura foi realizada manualmente, com densidade de 15 sementes para genótipos que apresentavam o fenótipo espiguetas normais e mosaico, e 20 sementes para genótipos que apresentavam o fenótipo espiguetas multiflora. O maior volume de sementes utilizado nos genótipos com espiguetas multiflora considerou os danos físicos proporcionados às sementes sem a casca aderida (nuas) no momento da trilha e o maior conteúdo de lipídeos, que reduzem a germinação das mesmas. As sementes foram tratadas com o inseticida Gaucho (Imidacloprid, 60 mL 100 kg de sementes⁻¹).

A adubação de base foi de 300 kg ha⁻¹ da fórmula 5-30-15 (N-P-K). Foram realizadas duas adubações nitrogenadas em cobertura em cada época de semeadura, próximo à quarta e à sétima folha, nas doses de 80 kg ha⁻¹ e 70 kg ha⁻¹ de uréia em cada aplicação, respectivamente. O controle de plantas invasoras foi realizado manualmente e o controle de moléstias de parte aérea foi realizado com o fungicida Tebucó Nortox (tebuconazole, 750 mL ha⁻¹). Na maturidade fisiológica, pelo menos 12 panículas de cada unidade experimental foram coletadas de forma aleatória. Estas panículas foram armazenadas em câmara fria e, posteriormente, uma amostra foi utilizada para a avaliação do caráter espiguetas multiflora.

3.1.3 Dados meteorológicos

As informações de temperatura máxima diária, temperatura mínima diária e precipitação pluviométrica, desde a semeadura até a maturidade fisiológica, foram utilizadas para identificar possíveis variações ambientais associadas com a expressividade variável do caráter espiguetas multiflora em aveia. Os dados foram obtidos a partir do Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa

(BDMEP), do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), disponível em www.inmet.gov.br/projetos/rede/pesquisa. Os dados foram coletados pela estação meteorológica de Porto Alegre, RS.

3.1.4 Avaliação do caráter espiguetas multiflora

Para avaliação do caráter espiguetas multiflora, quatro panículas de cada unidade experimental foram avaliadas, em cada época de semeadura. As panículas foram inicialmente divididas em três terços: terço inferior, terço médio e terço superior (Figura 3).

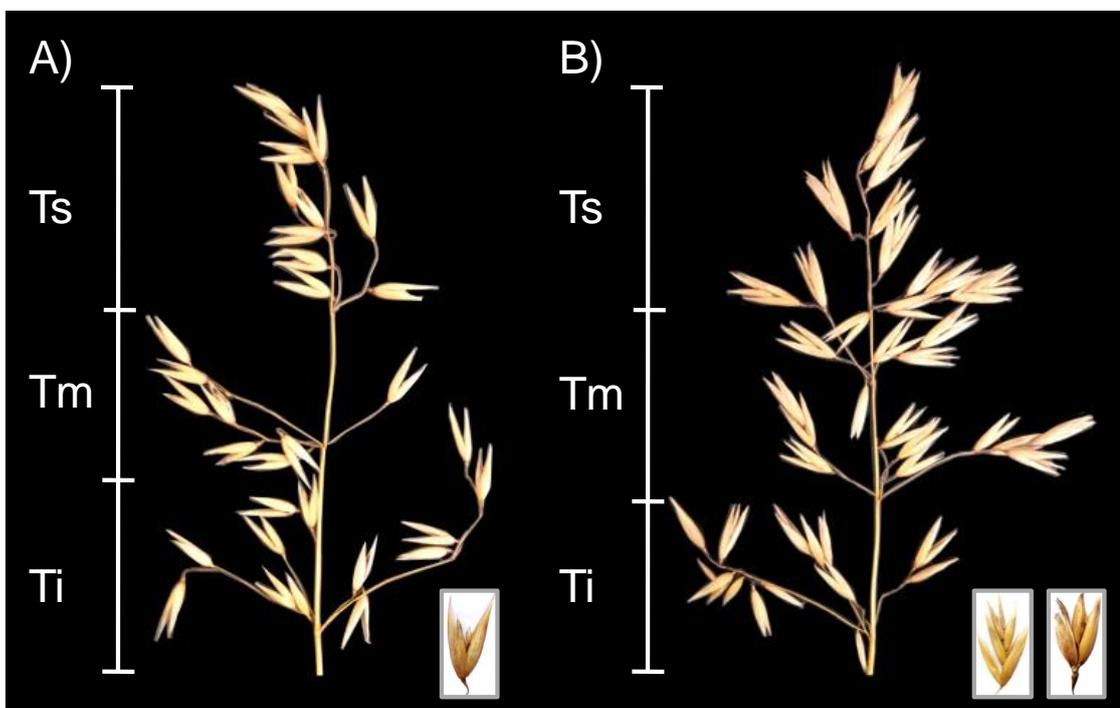


FIGURA 3. Diferentes tipos de panículas em aveia. Panículas com espiguetas normais (A) e panículas com espiguetas multiflora e mosaico (B). Ti = terço inferior; Tm = terço médio e Ts = terço superior.

O número de espiguetas normais, multiflora e mosaico foi quantificado em cada um dos terços e na panícula inteira. Espiguetas classificadas como normais apresentavam dois ou três flósculos (espiguetas determinadas). As espiguetas multiflora apresentavam de quatro a oito flósculos, com a ráquila alongada

(espiguetas indeterminadas). As espiguetas classificadas como mosaico apresentavam número variável de flósculos, com grãos com e sem casca (espiguetas intermediárias).

Nos diferentes terços, o número médio de espiguetas normais, multiflora e mosaico foi composto pela média aritmética das quatro panículas avaliadas. Com base nestes resultados, o número total de espiguetas normais, multiflora e mosaico foi determinado para a panícula inteira, através do somatório do número médio de espiguetas em cada um dos terços.

3.1.5 Análises estatísticas

A variação fenotípica observada nos genótipos (linhagens e genitores) para o carácter espiguetas multiflora, avaliado nos terços individuais e nas panículas inteiras, foi utilizada para a análise de distribuição de frequências. A análise foi realizada para cada época de semeadura avaliada e para as duas populações estudadas. O número de classes foi determinado pelo critério de pontos médios, a cada 10%, considerando a amplitude de variação de 0 a 100%. Desta forma, linhagens da população que estão classificadas em um determinado ponto médio apresentam variação de $\pm 5\%$.

Para as análises de distribuição de frequências e de variâncias os dados originais foram previamente transformados para percentagem, com o objetivo de permitir a comparação entre as proporções dos diferentes tipos de espiguetas entre os terços de cada panícula e entre os genótipos. A análise de variância foi utilizada a fim de detectar diferenças entre os genótipos para o carácter espiguetas multiflora avaliado dentro de cada terço e nas panículas inteiras. A análise de variância foi realizada considerando o seguinte modelo linear:

$$Y_{ijk} = m + G_i + A_j + GA_{ij} + B/A_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

em que:

m : média geral;

G_i : efeito do i -ésimo genótipo;

A_j : efeito da j -ésima época;

GA_{ij} : efeito da interação do i -ésimo genótipo com a j -ésima época;

B/A_{jk} : efeito do k -ésimo bloco dentro da j -ésima época;

ε_{ijk} : erro aleatório.

Após identificar efeito significativo da interação genótipo x época de semeadura, a comparação múltipla de médias entre as épocas de semeadura foi realizada pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, apenas para os genitores de cada população. Análises de regressão linear do caráter espiguetas multiflora foram realizadas para cada terço da panícula, nas duas populações, utilizando os dados originais (número de espiguetas). A primeira época de semeadura representou a variável independente, enquanto a segunda época de semeadura foi considerada a variável dependente. A análise de variância e a comparação de médias foram realizadas com auxílio do programa estatístico Genes (Cruz, 2013). O *software* SAS foi empregado para a realização da análise de distribuição de frequências. Os gráficos de distribuição de frequências e as análises de regressão foram realizadas pelo programa SigmaPlot 12.

3.2 Análise genética do caráter espiguetas multiflora em aveia

3.2.1 Hipótese genética

A hipótese de que um gene maior determina a formação de espiguetas multiflora em aveia foi testada nas duas populações em estudo. Considerando que as linhagens encontravam-se em elevada homozigose, a frequência esperada foi de 1:1 (linhagem indeterminada:linhagem indeterminada), respectivamente. Um total de 92 e 90 linhagens foi considerado para a análise das populações “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1” e “URS Taura x UFRGS017004-2”, respectivamente.

As linhagens foram divididas em duas classes fenotípicas distintas: determinadas e indeterminadas. As linhagens classificadas como determinadas apresentavam apenas espiguetas normais na mesma panícula. As linhagens classificadas como indeterminadas apresentavam expressividade variável para a formação de espiguetas, podendo apresentar espiguetas normais, multiflora e mosaico em uma mesma panícula. Por considerar que as espiguetas mosaico apresentam um fenótipo intermediário, com modificações estruturais importantes que as diferenciam das espiguetas normais, as linhagens que possuíam este fenótipo foram classificadas no mesmo grupo das linhagens multiflora.

3.2.2 Teste de qui-quadrado (χ^2)

O teste de qui-quadrado foi utilizado para verificar a aderência da hipótese genética às proporções fenotípicas observadas e esperadas, a 5% de probabilidade de erro, de acordo com o modelo proposto por Steel & Torrie (1980):

$$\chi^2 = \sum (F_O - F_E)^2 / F_E \quad \text{com } n - 1 \text{ graus de liberdade.}$$

em que:

F_O : frequência observada;

F_E : frequência esperada;

n : número de classes fenotípicas.

3.3 Análise molecular do caráter espiguetas multiflora em aveia

Esta etapa do trabalho visou identificar, clonar e sequenciar genes candidatos ao controle do caráter espiguetas multiflora em aveia. Considerando a elevada estabilidade fenotípica dos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2 para o caráter espiguetas multiflora, nas duas épocas de semeadura, apenas estes genótipos foram utilizados para a realização das análises moleculares. A caracterização molecular foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Departamento de Plantas de Lavoura, na Faculdade de Agronomia da UFRGS, localizado em Porto Alegre, RS.

3.3.1 Ortologia do gene *AP2* em gramíneas

Sequências genômicas do gene *AP2* de trigo, cevada, *Brachypodium distachyon*, milho e setária foram utilizadas como referência para a amplificação de sequências de aveia com identidade molecular a este gene. Estas sequências foram selecionadas de forma minuciosa no banco de dados do GenBank, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>. Um total de 30 sequências de DNA genômico referentes ao gene *AP2*, de um grande número de espécies, foram armazenadas em um banco de dados local para análises *in silico*.

3.3.2 Alinhamento múltiplo de sequências e desenho de *primers*

O alinhamento múltiplo das sequências genômicas codificantes do gene *AP2* foi realizado utilizando a ferramenta CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994), disponível no programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999). Após o alinhamento, uma sequência consenso entre as sequências alinhadas foi gerada. A sequência consenso representou regiões exônicas conservadas para o gene *AP2* entre as sequências de gramíneas empregadas no alinhamento. A sequência consenso foi alinhada com a sequência completa do gene *AP2* de *Brachypodium distachyon* (acesso 100828894) (Vogel *et al.*, 2010), com o objetivo de localizar os éxons e íntrons presentes na sequência consenso.

Sequências de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) foram ancorados nas regiões codificantes conservadas entre as espécies. Os *primers* foram desenvolvidos com auxílio do programa Primer3Plus (Untergasser *et al.*, 2007), considerando os seguintes parâmetros: a) tamanho dos produtos de amplificação esperado entre 200 e 600 pares de bases; b) tamanho da sequência do *primer* de no mínimo 16 nucleotídeos, ótimo com 20 nucleotídeos e máximo com 22 nucleotídeos; c) temperatura de pareamento mínima de 58°C, ótima de 60°C e máxima de 62°C e; d) concentração ótima de bases guanina/citosina em 50%.

Um total de oito pares de *primers* foi desenvolvido para a amplificação de regiões genômicas candidatas ao gene *AP2* em aveia. Além dos *primers* desenvolvidos para o gene *AP2*, *primers* descritos na literatura para os genes *Vrn1* (Nava *et al.*, 2012) e *AGL6* (Reinheimer & Kellogg, 2009) de aveia também foram testados neste estudo (Tabela 2).

TABELA 2. Sequência e orientação dos pares de *primers* utilizados na amplificação dos genes *Vrn1*, *AP2* e *AGL6* nos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2.

<i>Primers</i>	Orientação 5' – 3'	
	<i>Forward</i> (direta)	<i>Reverse</i> (reversa)
Ver1.18	ACTGAAGGCGAAGGTTGAGA	TGGATTCGTGCATAAGTTGG
Ap2.1	GTCGACGCCGACATAAACTT	CCAGTTCCTCGGCAAGAAG
Ap2.2	GTCGACGCCGACATAAACTT	CCAGTTCCTCGGCAAGAA
Ap2.3	TCGACGCCGACATAAACTTC	CCAGTTCCTCGGCAAGAAG
Ap2.4	GTCGACGCCGACATAAACTT	CCAGTTCCTCGGCAAGAA
Ap2.5	GGATTTGACACTGCACATGCT	AGTACAGAGGCGTCACCCTG
Ap2.6	GGATTTGACACTGCACATGCT	CCAAGTACAGAGGCGTCACC
Ap2.7	AGCGACTACGAGGACGACAT	CCTAGCACATATGAGGGGGA
Ap2.8	CAAAGGAGGAGTTCGTCCAC	CCTAGCACATATGAGGGGGA
AGL6	GAGCTGGTACCAGGAAATGTCAA	TTCATGCTGGGATGGGTT

Os pares de *primers* descritos anteriormente foram ancorados em regiões codificantes do gene *AP2*, considerando a estrutura do gene de *Brachypodium distachyon* (Figura 4). A ancoragem dos pares de *primers* em regiões exônicas do gene *AP2* objetivou aumentar a probabilidade de amplificação em aveia, uma vez que estas regiões apresentam maior conservação entre as espécies.

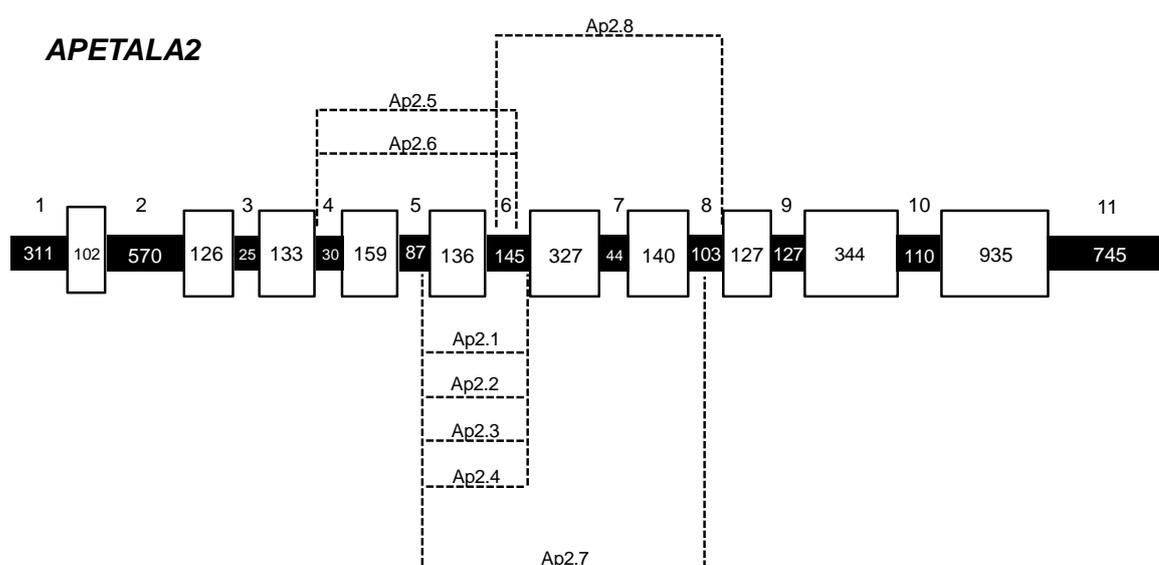


FIGURA 4. Estrutura do gene *AP2* em *Brachypodium distachyon* com as combinações de *primers* ancoradas em regiões exônicas distintas do gene. Barras em preto indicam os éxons.

3.3.3 Isolamento e purificação do DNA

Aproximadamente 15 sementes de cada genótipo foram germinadas em caixas plásticas (gerbox) contendo papel *germitest*, em condições de temperatura e luminosidade ambiente. Após nove dias, quando as plântulas apresentavam cerca de sete centímetros, 0,1 a 0,2 g de tecidos do coleóptilo de no mínimo seis plântulas de cada genótipo foram coletados e macerados com nitrogênio líquido.

O DNA dos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2 foi isolado e purificado de acordo com o protocolo adaptado de Lodhi *et al.* (1994) e de Lefort & Douglas (1999). Em cada amostra de tecido macerado, foram adicionados 600 μL da solução tampão de extração (contendo 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de β -mercaptoetanol) e aproximadamente 2 g de PVPP (polivinilpolipirrolidona). As amostras foram misturadas e incubadas a 60°C por 25 minutos. Após a incubação, foi adicionado 600 μL de CIA (clorofórmio:álcool isoamílico 24:1). As amostras foram continuamente invertidas por quatro minutos para formar uma emulsão.

A emulsão formada foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos. Aproximadamente 400 μL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo. Um total de 250 μL de NaCl (5 M) foi adicionado ao sobrenadante. Logo após, 750 μL de isopropanol gelado foram adicionados à solução. Posteriormente, a solução foi refrigerada a 4°C por 15 a 20 minutos. Depois do resfriamento a solução foi centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos, em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi lavado duas vezes com 500 μL de etanol (75%).

O *pellet* lavado foi seco a 30°C por 35 minutos e, posteriormente, foi ressuspenso em 100 μL de TE 1x em pH 8,0 + RNase (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$), formando a solução com o DNA extraído. A solução foi incubada a 50°C por 15 minutos. A qualidade e a concentração do DNA purificado foram observadas em gel de

agarose 1% e em espectrofotômetro. Após esta etapa, uma alíquota da solução estoque de DNA de cada genótipo foi diluída e ajustada para solução de trabalho, na concentração final de $15 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

3.3.4 Amplificação dos genes *Vrn1*, *AP2* e *AGL6* em aveia

A amplificação do gene *Vrn1* e de regiões genômicas candidatas aos genes *AP2* e *AGL6* em aveia foi realizada através de reações de PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Diferentes combinações de pares de *primers*, desenvolvidas a partir de alinhamentos múltiplos entre sequências dos respectivos genes, foram testadas conforme descrito no item 3.3.2. A sequência e orientação de cada par de *primer* utilizado estão apresentados na Tabela 2.

As combinações de *primers* foram testadas nos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2. As reações de amplificação foram conduzidas em termocicladores *C1000 Touch™ Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). O volume de cada reação foi de $15 \mu\text{L}$ com $2,5 \text{ mM}$ de MgCl_2 , $200 \mu\text{M}$ de dNTP, 1 unidade da enzima *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen), 1x PCR *buffer*, $200 \mu\text{M}$ de cada unidade do *primer* (“*forward*” e “*reverse*”) e 30 ng de DNA.

As condições de amplificação para cada reação foram: desnaturação inicial por três minutos a 94°C ; seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C (desnaturação), 45 segundos na temperatura específica de pareamento para cada combinação de *primers* (63°C para Ver-1.18; 57°C para Ap2.7 e 51°C para AGL6) e dois minutos a 72°C (extensão). Uma reação final de extensão foi conduzida por 10 minutos a 72°C . As reações foram armazenadas a 4°C ou a -20°C até a etapa de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Durante a eletroforese as amostras permaneceram submersas em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) 0,5x por uma hora e 30 minutos a 100 volts.

3.3.5 Clonagem e sequenciamento

3.3.5.1 Excisão e reamplificação dos fragmentos de interesse

Os produtos de amplificação dos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2 de tamanho esperado para as combinações de *primers* testadas Ver1.18, Ap2.7 e AGL6 foram excisados do gel de agarose e purificados pelo kit de extração de DNA *PureLink® Quick Extration* (Invitrogen). Após a purificação, os fragmentos de DNA de interesse de cada gene foram reamplificados com as suas respectivas combinações de *primers*, a fim de observar se a amplificação ocorreu na região de interesse. As reações de reamplificação seguiram as mesmas condições de amplificação descritas no item 3.3.4. Os produtos de amplificação gerados a partir das combinações de *primers* testadas foram clonados.

3.3.5.2 Preparo de células competentes

Células competentes da bactéria *Escherichia coli* (XL1-Blue) provenientes da multiplicação de uma suspensão bacteriana pré-existente foram utilizadas para a clonagem. Uma colônia, proveniente do plaqueamento de uma suspensão bacteriana, foi incubada a 37°C por 16 horas sob agitação de 200 rpm, em 3 mL de meio LB líquido (10 g L⁻¹ de peptona + 5g L⁻¹ de extrato de levedura + 5 g L⁻¹ de NaCl), contendo o antibiótico tetraciclina (10 mg mL⁻¹), ao qual a bactéria *Escherichia coli* (XL1-Blue) é resistente.

O volume de 2 mL do inóculo de células preparado na etapa anterior foi transferido para 100 mL de um novo meio de cultura LB líquido (contendo tetraciclina), e incubado a 37°C por três horas sob agitação de 250 rpm. A densidade óptica de 600 nm do meio LB líquido com as bactérias foi mensurada periodicamente. Quando o valor próximo a 0,5 foi alcançado, o crescimento bacteriano foi interrompido. O meio LB líquido com as células competentes foi

mantido no gelo por 20 minutos. Posteriormente, o volume da solução de 100 mL foi dividido em dois tubos de 50 mL. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos, a 5.600 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet*, contendo as células bacterianas, foi ressuscitado em 50 mL de glicerol (10%) gelado para cada tubo.

As etapas de centrifugação, descarte do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* foram realizadas por mais três vezes. O volume de glicerol (10%) gelado adicionado na etapa de ressuspensão foi reduzido para metade na segunda vez; para 2 mL na terceira vez e para 0,4 mL na quarta vez. Alíquotas de 40 µL da nova suspensão bacteriana foram distribuídas em tubos de 0,6 mL (autoclavados), congeladas imediatamente em nitrogênio líquido, e armazenadas no ultrafreezer a -88°C. Esta etapa de preparo das células competentes foi realizada no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Centro de Biotecnologia da UFRGS, localizado em Porto Alegre, RS.

3.3.5.3 Reações de ligação e transformação de células competentes

Após o preparo das células competentes, o protocolo utilizado nas próximas etapas de clonagem foi adaptado de Nava *et al.* (2012). As reações de ligação foram realizadas em um volume final de 6 µL, contendo 1 µL do produto de reamplificação, 1µL do vetor PCR™ 2.1-TOPO® (Invitrogen) contendo a enzima ligase, 0,25 µL da solução salina (1,2 M de NaCl e 0,06 M de MgCl₂) e 3,75 µL de água ultrapura Milli-Q®. Cada reação foi misturada gentilmente, mantida a temperatura ambiente por 15 minutos e armazenada em geladeira a 4°C.

A transformação das células competentes da bactéria *Escherichia coli* (XL1-Blue) foi realizada pelo método de eletroporação. A solução de transformação, contendo 40 µL de células competentes (descongeladas em gelo), adicionado de 2 µL da reação de clonagem, foi incubada por um minuto em gelo,

e logo após, transferida para a cubeta de eletroporação. Imediatamente após a eletroporação, foi adicionado 1 mL do meio LB líquido (sem o antibiótico tetraciclina) à cubeta, para a transferência das células transformadas em um tubo *ependorff* de 2 mL. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Fitopatologia Molecular, na Faculdade de Agronomia da UFRGS, localizado em Porto Alegre, RS.

3.3.5.4 Multiplicação das células transformadas

As células transformadas foram mantidas sob agitação de 200 rpm, a 37°C, por uma hora e 10 minutos para promover a multiplicação das células transformadas. Nesta etapa, os tubos permaneceram na posição horizontal. Durante este período de agitação, 40 µL de X-gal (40 mg mL⁻¹) diluído em dimetil-formaldeído e 40 µL de IPTG (100 mM) foram distribuídos na superfície de placas de Petri, contendo meio LB sólido e os antibióticos tetraciclina (10 mg mL⁻¹) e canamicina (50 mg mL⁻¹). Após a adição destas substâncias, as placas de Petri foram mantidas a 37°C, a fim de fornecer uma condição ideal para o crescimento das bactérias.

O antibiótico tetraciclina seleciona a bactéria *Escherichia coli* (XL1-Blue), enquanto a canamicina seleciona células bacterianas que contém o vetor PCR™2.1-TOPO®. A solução X-gal é responsável pela coloração azul das colônias que contém apenas o vetor, sem a inserção do fragmento de DNA desejado, enquanto o IPTG é necessário para a indução da coloração das colônias bacterianas.

Após o período de agitação das células transformadas e da adição de tetraciclina e canamicina nas placas de Petri, um volume de 200 µL de células transformadas foi distribuído em cada placa. Desta forma, cinco placas de Petri

para cada reação de transformação foram utilizadas. Após o plaqueamento das células transformadas, as placas de Petri foram incubadas a 37°C por 14 horas (*overnight*).

3.3.5.5 Seleção de clones, multiplicação e purificação dos plasmídeos

Após a multiplicação das células, 12 colônias individuais de coloração branca para cada reação de transformação foram repicadas em 5 mL do meio de cultura LB líquido, contendo os antibióticos tetraciclina e canamicina nas mesmas concentrações apresentadas anteriormente. Nesta etapa, tubos falcon de 50 mL foram utilizados, a fim de fornecer uma condição aeróbica adequada ao crescimento das células. As colônias brancas representavam células bacterianas efetivamente transformadas e, portanto, apresentavam o fragmento de DNA de interesse inserido no vetor. Cada colônia foi incubada a 37°C sob agitação de 100 rpm por um período de 14 horas (*overnight*), promovendo a multiplicação das células bacterianas de cada colônia. Um controle negativo do meio de cultura, livre de inoculação, foi empregado com o propósito de assegurar que o meio de cultura não apresentava contaminação por outros microrganismos.

Após o período de incubação, os tubos contendo meio de cultura e células multiplicadas foram centrifugados a 8.000 rpm por 8 a 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado (o qual continha as células transformadas) foi ressuscitado em 500 µL de MgSO₄ (10 mM). A solução ressuscitada foi aquecida a 100°C em termociclador, por 10 minutos, promovendo a separação do plasmídeo (vetor + fragmento amplificado) da bactéria. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 12.500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado (o qual continha os plasmídeos) e armazenado a 4°C.

3.3.5.6 Amplificação dos insertos e preparo de amostras para o sequenciamento

A etapa de amplificação dos insertos foi conduzida em duas reações principais. Na primeira reação, 5 µL do sobrenadante coletado foram adicionados ao coquetel, contendo 62 µL de água ultrapura Milli-Q[®], 10 µL de Taq Buffer 10x e 3 µL de MgCl₂ (50 mM). A reação foi incubada em termociclador por 30 minutos a 94°C. Na segunda reação, 20 µL da primeira reação foram adicionados ao coquetel, contendo 15,9 µL de água ultrapura Milli-Q[®], 2 µL de dNTPs (10 mM), 0,8 µL do *primer* universal M13 *Foward* (10 µM), 0,8 µL do *primer* universal M13 *Reverse* (10 µM) e 0,5 µL da enzima Taq DNA Polimerase de alta fidelidade (Invitrogen). As condições de amplificação foram: 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 55°C e 2 minutos a 72°C. Uma reação final de extensão foi realizada por 10 minutos a 72°C e mantida a 4°C.

O produto de amplificação dos insertos foi visualizado em gel de agarose a 1,5%, a fim de avaliar a qualidade e tamanho dos fragmentos de DNA clonados. Apenas fragmentos com tamanho esperado de amplificação para cada combinação de *primers* foram selecionados para o sequenciamento. A reação de sequenciamento para cada fragmento selecionado continha 40 ng de DNA, 0,5 µL do primer M13 *Foward* (10 µM) e água ultrapura Milli-Q[®], em um volume total de 6 µL. As amostras foram enviadas para o laboratório Ludwig Biotec, localizado em Alvorada, RS, e para a Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas do Hospital de Clínicas da UFRGS, localizado em Porto Alegre, RS.

3.3.6 Análise *in silico* dos fragmentos clonados

Após o sequenciamento, as sequências de aveia obtidas para as combinações de *primers* dos genes *Vrn1*, *AP2* e *AGL6*, dos genitores URS Taura

e UFRGS 017004-2, foram exportadas dos eletroferogramas e armazenadas em arquivos no formato FASTA. Sequências correspondentes ao vetor de clonagem foram identificadas e removidas manualmente. Posteriormente, as sequências de nucleotídeos de aveia foram comparadas com outras sequências disponíveis em bancos de dados moleculares, utilizando a ferramenta BLAST (*Basic Linear Alignment Sequence Tool*).

A partir dos resultados da análise de BLAST, as sequências com elevada similaridade de nucleotídeos para os genes *Vrn1*, *AP2* e *AGL6* em outras espécies e/ou em aveia disponíveis no GenBank, foram alinhadas com as sequências de aveia obtidas no presente estudo. As sequências de aveia correspondentes ao gene *Vrn1* foram alinhadas com a sequência de trigo (acesso AY747600.1). As sequências candidatas ao gene *AP2* foram comparadas com sequências de *Brachypodium distachyon* (acesso XM_010233483.1), trigo (acesso AJ577368.1) e cevada (acesso AK370055.1). As sequências do gene *AGL6* foram alinhadas com sequências de aveia preta (acesso GQ496644.1), aveia branca (acesso GQ496645.1), cevada (acessos GQ496642.1 e AY541067.1), *Brachypodium distachyon* (acesso GQ496641.1), *Triticum monococcum* (acesso GQ496643.1) e *Lolium temulentum* (acesso GQ496646.1). O alinhamento múltiplo das sequências foi realizado com auxílio do programa BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999).

A partir dos alinhamentos descritos acima, foi possível determinar o nível de identidade molecular entre: i) as sequências de aveia obtidas no presente estudo com as sequências disponíveis nos bancos de dados moleculares e ii) as sequências dos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2. O nível de polimorfismo foi estimado pela frequência de SNPs (*Single Nucleotide*

Polymorphisms) presente nas diferentes sequências analisadas para a mesma combinação de *primers*.

Sequências exônicas do gene *Vrn1* foram traduzidas em sequências de aminoácidos, quando foi identificada a ocorrência de SNPs entre os genitores URS Taura e UFRGS 017004-2. Para as sequências genômicas candidatas aos genes *AP2*, parte de uma possível região codificadora de proteína ou polipeptídeo, aqui descrita como ORF (*Open Reading Frame*), foi identificada. As sequências genômicas referentes ao gene *AGL6* foram convertidas para sequências de aminoácidos e comparadas com a sequência completa de aminoácidos de cevada (acesso AY541067.1). A conversão das sequências de DNA para sequências de aminoácidos foi realizada com auxílio do programa Mega 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). As figuras de cada alinhamento foram geradas com auxílio do programa GeneDoc (Nicholas & Nicholas, 1997).

A estrutura tridimensional (3D) de uma possível proteína do gene *AP2* em aveia foi modelada na plataforma SWISS-MODEL, disponível em <http://swissmodel.expasy.org>, para os dois genitores. As estruturas 3D foram visualizadas no programa RasMol Version 2.7.5.2 (Sayle & Milner-White, 1995). Sequências genômicas correspondentes ao gene *AP2* foram convertidas para RNA e alinhadas com a sequência do *miR172a* (acesso MI0018110) de *Brachypodium distachyon*, disponível no banco de dados online miRBase (<http://www.mirbase.org>).

4 RESULTADOS

Os resultados apresentados neste trabalho incluem: i) a análise fenotípica do caráter espiguetas multiflora em aveia, em duas épocas distintas de semeadura; ii) a análise genética do caráter espiguetas multiflora em aveia e iii) a análise molecular de genes candidatos ao controle do caráter espiguetas multiflora em aveia, que envolveu a identificação de sequências genômicas associadas a estes genes.

4.1 Análise fenotípica do caráter espiguetas multiflora em aveia

A análise fenotípica do caráter espiguetas multiflora consistiu na avaliação do número de espiguetas normais, multiflora e mosaico, em cada um dos três terços da panícula (inferior, médio e superior) e na panícula inteira.

4.1.1 Dados meteorológicos

As condições de temperatura durante o período de condução dos experimentos nas duas épocas de semeadura foi muito similar. No entanto, a precipitação pluviométrica foi aproximadamente 50% superior no período vegetativo referente à primeira época de semeadura. Além disso, deve-se considerar que o comprimento do dia foi maior na segunda época de semeadura. Também foi possível verificar picos de temperatura em momentos determinantes para a formação das inflorescências na segunda época de semeadura (Figura 5).

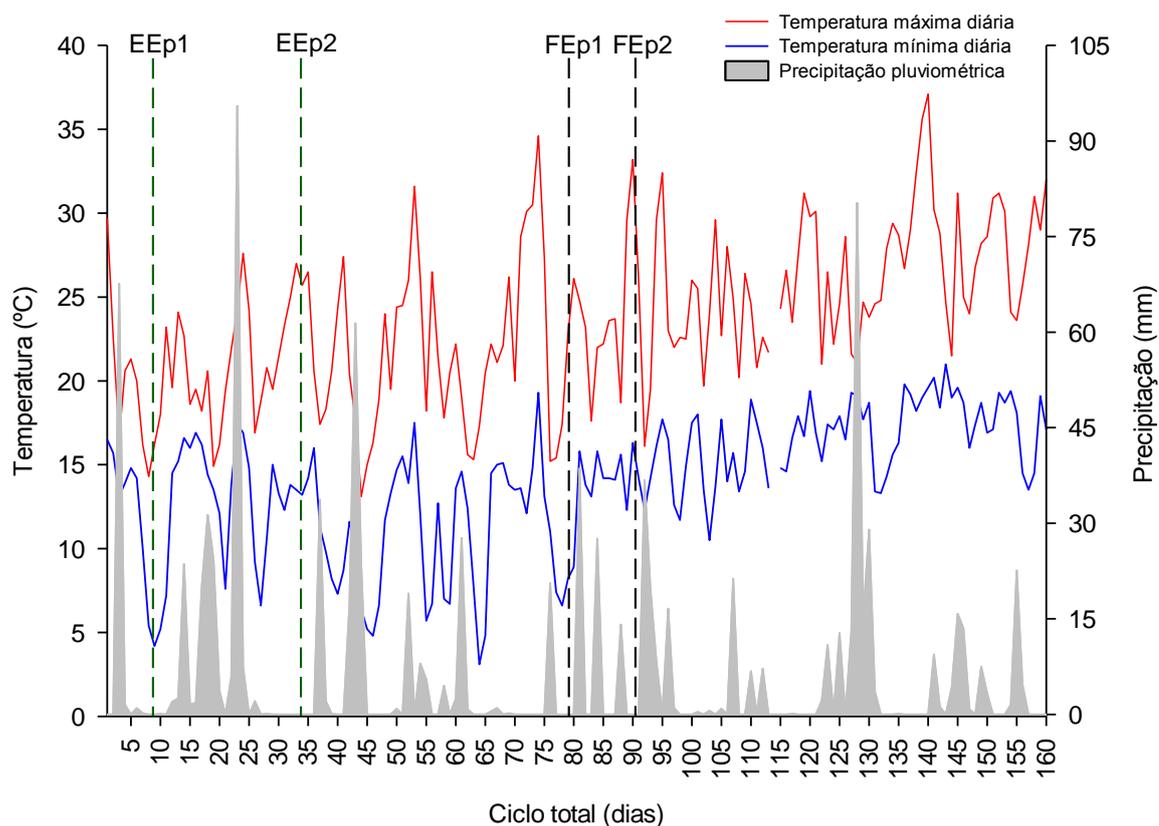


FIGURA 5. Precipitação pluviométrica, temperatura máxima diária e temperatura mínima diária da semeadura até a maturidade fisiológica. A temperatura mínima média durante o período vegetativo foi de 11,6°C para ambas as épocas de semeadura. A temperatura máxima média durante o período vegetativo foi de 21,5°C e 22,3°C para as épocas 1 e 2, respectivamente. A precipitação acumulada durante o período vegetativo foi de 451 mm para a época 1 e 310 mm para a época 2. EEp1 = emergência da época 1; EEp2 = emergência da época 2; FEp1 = início do florescimento na época 1; FEp2 = início do florescimento na época 2. Fonte: INMET.

4.1.2 Análise dos dados fenotípicos

4.1.2.1 Distribuição de frequências

A distribuição de frequências dos fenótipos espiguetas normais, multiflora e mosaico, avaliados em cada um dos terços da panícula, nas duas épocas de semeadura para a população “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1” estão apresentados na Figura 6. Das 92 linhagens avaliadas, aproximadamente 46 linhagens apresentaram o fenótipo 100% de espiguetas normais no terço inferior, nas duas épocas de semeadura. Por outro lado, considerando as demais classes

fenotípicas, uma menor formação de espiguetas normais foi observada entre as linhagens com expressividade variável na segunda época de semeadura (Figura 6A).

Analisando a porcentagem de espiguetas multiflora no terço inferior, foi possível observar que nenhuma das 92 linhagens avaliadas na primeira época de semeadura apresentou o fenótipo 100% espiguetas multiflora. Já para a segunda época de semeadura, 12 linhagens avaliadas apresentaram o fenótipo 100% espiguetas multiflora no terço inferior. A maior formação de espiguetas multiflora também foi observada para as linhagens pertencentes às demais classes fenotípicas na segunda época de semeadura (Figura 6B). Para o fenótipo espiguetas mosaico, definido como espiguetas que apresentam número variável de flósculos com grãos com e sem casca, 11 e sete linhagens apresentaram o fenótipo 100% espiguetas mosaico na primeira e na segunda época de semeadura, respectivamente. Por outro lado, pouco mais de 50% das linhagens, em cada época de semeadura, não apresentaram o fenótipo espiguetas mosaico (Figura 6C).

Ao avaliar a formação das espiguetas no terço médio das panículas, observou-se que aproximadamente 46 linhagens apresentaram o fenótipo 100% espiguetas normais nas duas épocas de semeadura avaliadas (Figura 6D). Entretanto, apenas zero e 12 linhagens apresentaram o fenótipo 100% de espiguetas multiflora no terço médio, na primeira e na segunda época de semeadura, respectivamente (Figura 6E). Para o fenótipo espiguetas mosaico, nove e três linhagens apresentaram 100% de espiguetas mosaico no terço médio, entre as épocas de semeadura avaliadas. Estes resultados demonstraram que houve uma redução no número de linhagens com o fenótipo 100% espiguetas mosaico no terço médio em comparação ao terço inferior, para as duas épocas de

semeadura. Já o número de linhagens que não apresentou espiguetas mosaico no terço médio foi similar ao observado no terço inferior, em ambas as épocas de semeadura (Figura 6F).

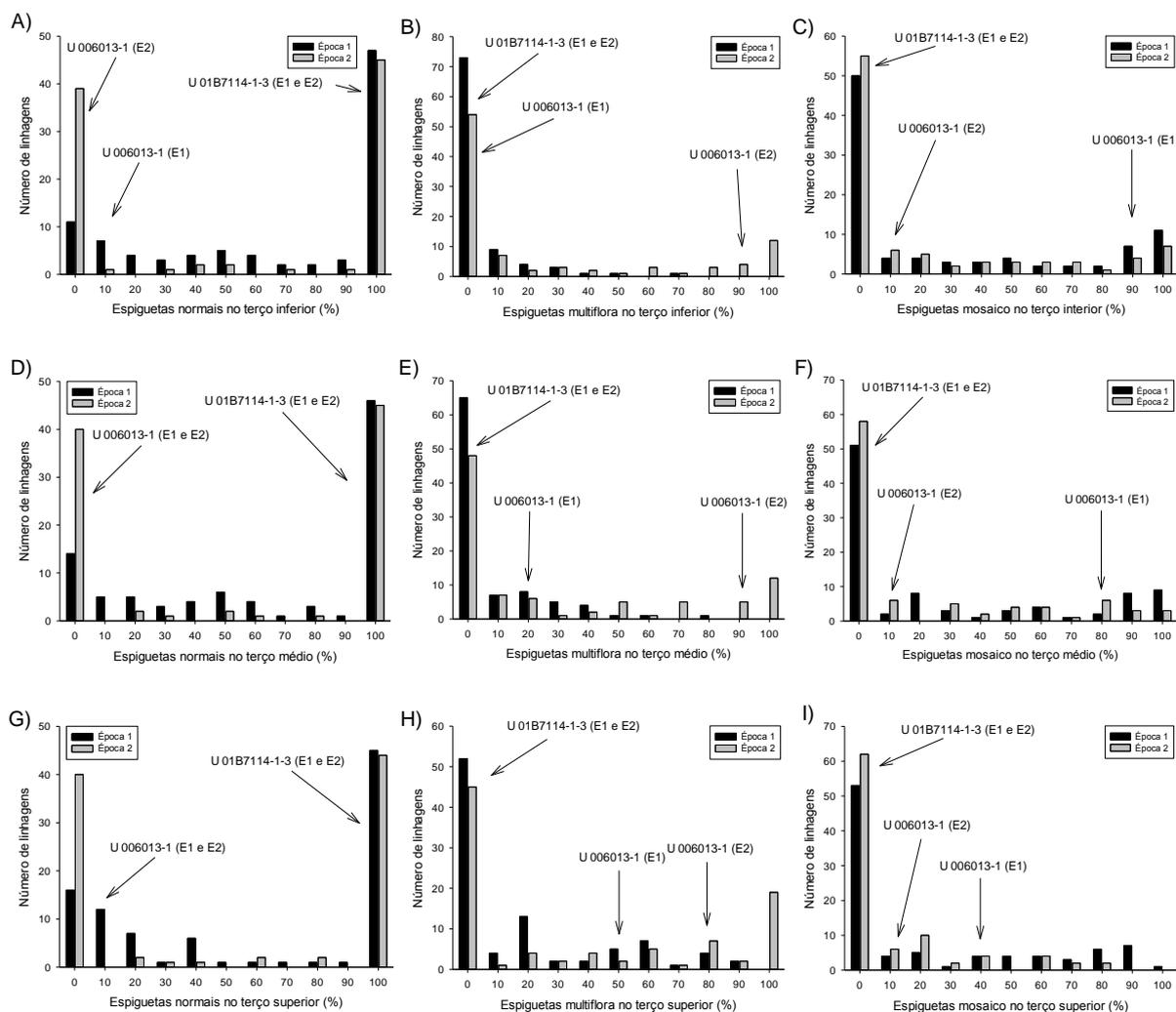


FIGURA 6. Distribuição de frequências das linhagens de aveia derivadas do cruzamento UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1 para fenótipos relacionados com o caráter espiguetas multiflora, em duas épocas de semeadura, avaliadas no ano de 2014. As flechas indicam as classes em que se encontram os genitores em cada época de semeadura. E1 = época 1 e E2 = época 2.

Analisando o terço superior da panícula, aproximadamente 45 linhagens apresentaram o fenótipo 100% espiguetas normais, nas duas épocas de semeadura (Figura 6G). Da mesma forma que observado para o terço inferior e médio, nenhuma linhagem apresentou o fenótipo 100% espiguetas multiflora na

primeira época de semeadura. No entanto, 19 linhagens apresentaram o fenótipo 100% espiguetas multiflora na segunda época de semeadura. Estes resultados indicaram o maior número de linhagens com este fenótipo no terço superior em comparação com o terço inferior e médio da panícula (Figura 6H). Considerando a formação de espiguetas mosaico no terço superior, apenas uma linhagem apresentou 100% de espiguetas mosaico neste terço, na primeira época de semeadura, enquanto nenhuma linhagem foi observada na segunda época de semeadura. O número de linhagens que não apresentou o fenótipo espiguetas mosaico no terço superior foi similar com os terços inferior e médio da panícula (Figura 6I).

A distribuição de frequências dos fenótipos espiguetas normais, multiflora e mosaico avaliados na população “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1”, considerando a panícula inteira, está apresentada na Figura 7. Verificou-se que 46 e 44 linhagens apresentaram o fenótipo 100% espiguetas normais na primeira e segunda época de semeadura, respectivamente (Figura 7A). Estes resultados demonstraram que para as duas épocas de semeadura aproximadamente 50% das linhagens avaliadas apresentaram elevada estabilidade para a formação de espiguetas normais, considerando a panícula inteira.

Os resultados também indicaram o aumento no número de linhagens com 100% de espiguetas multiflora na segunda época de semeadura, sendo que 12 linhagens apresentaram este fenótipo (Figura 7B). Para o fenótipo mosaico, linhagens com 100% de espiguetas mosaico foram observadas somente na primeira época de semeadura. O número de linhagens que não apresentou o fenótipo espiguetas mosaico foi similar entre as épocas de semeadura (Figura 7C).

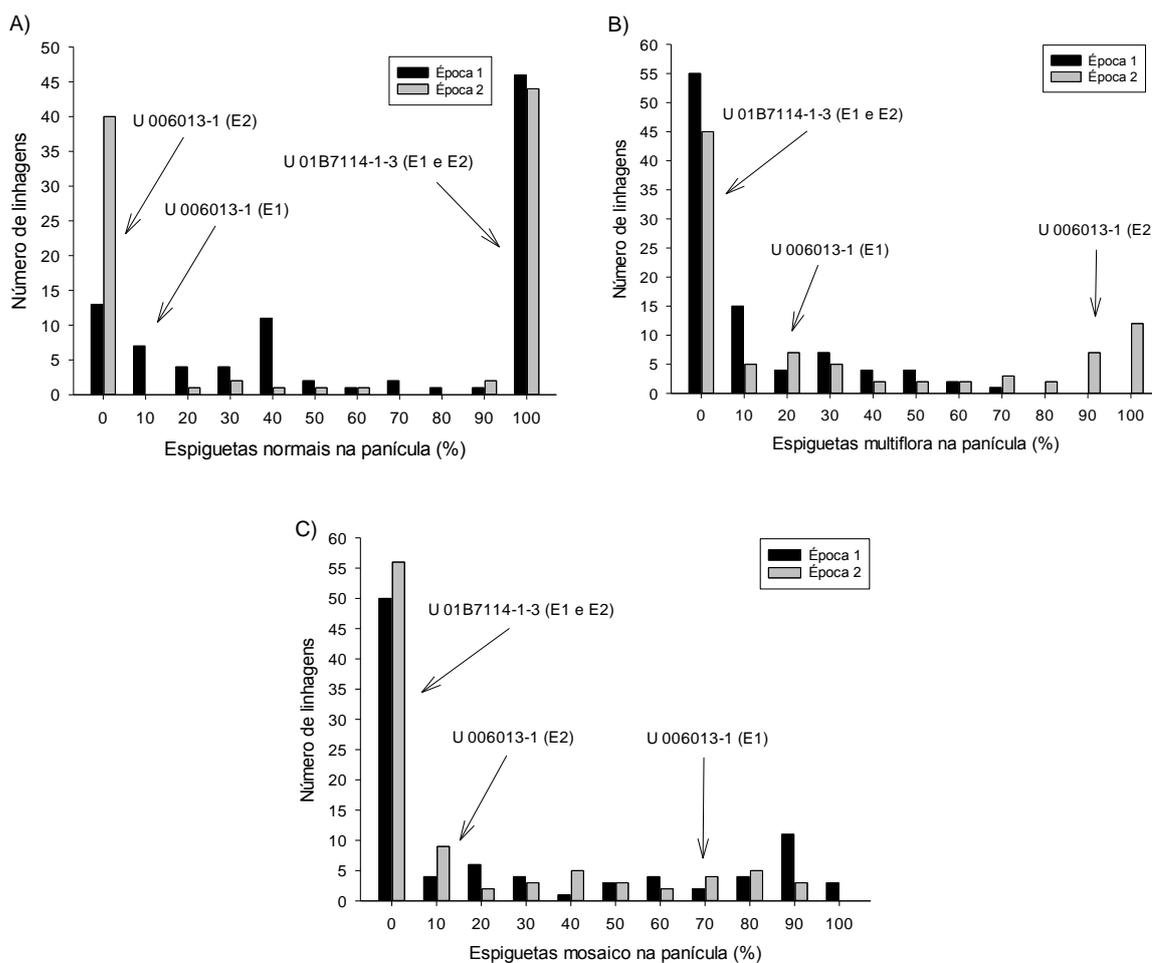


FIGURA 7. Distribuição de frequências das linhagens de aveia derivadas do cruzamento UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1 para os fenótipos espiguetas normais, multiflora e mosaico, em duas épocas de semeadura, avaliadas no ano de 2014. As flechas indicam as classes em que se encontram os genitores em cada época de semeadura. E1 = época 1 e E2 = época 2.

A distribuição de frequências do caráter espiguetas multiflora, expresso pelos fenótipos espiguetas normais, multiflora e mosaico, avaliados em cada um dos terços da panícula, nas duas épocas de semeadura para a população “URS Taura x UFRGS 017004-2” está apresentada na Figura 8. Das 90 linhagens avaliadas, 56 apresentaram 100% das espiguetas normais no terço inferior da panícula, nas duas épocas de semeadura (Figura 8A). Analisando o fenótipo espiguetas multiflora no terço inferior, uma e 17 linhagens apresentaram 100% das espiguetas multiflora, na primeira e na segunda época de semeadura, respectivamente (Figura 8B). A formação de espiguetas mosaico no terço inferior

da panícula se manteve similar entre as épocas de semeadura, tanto entre as linhagens que apresentaram 100% de espiguetas mosaico, quanto em linhagens com a ausência deste fenótipo (Figura 8C).

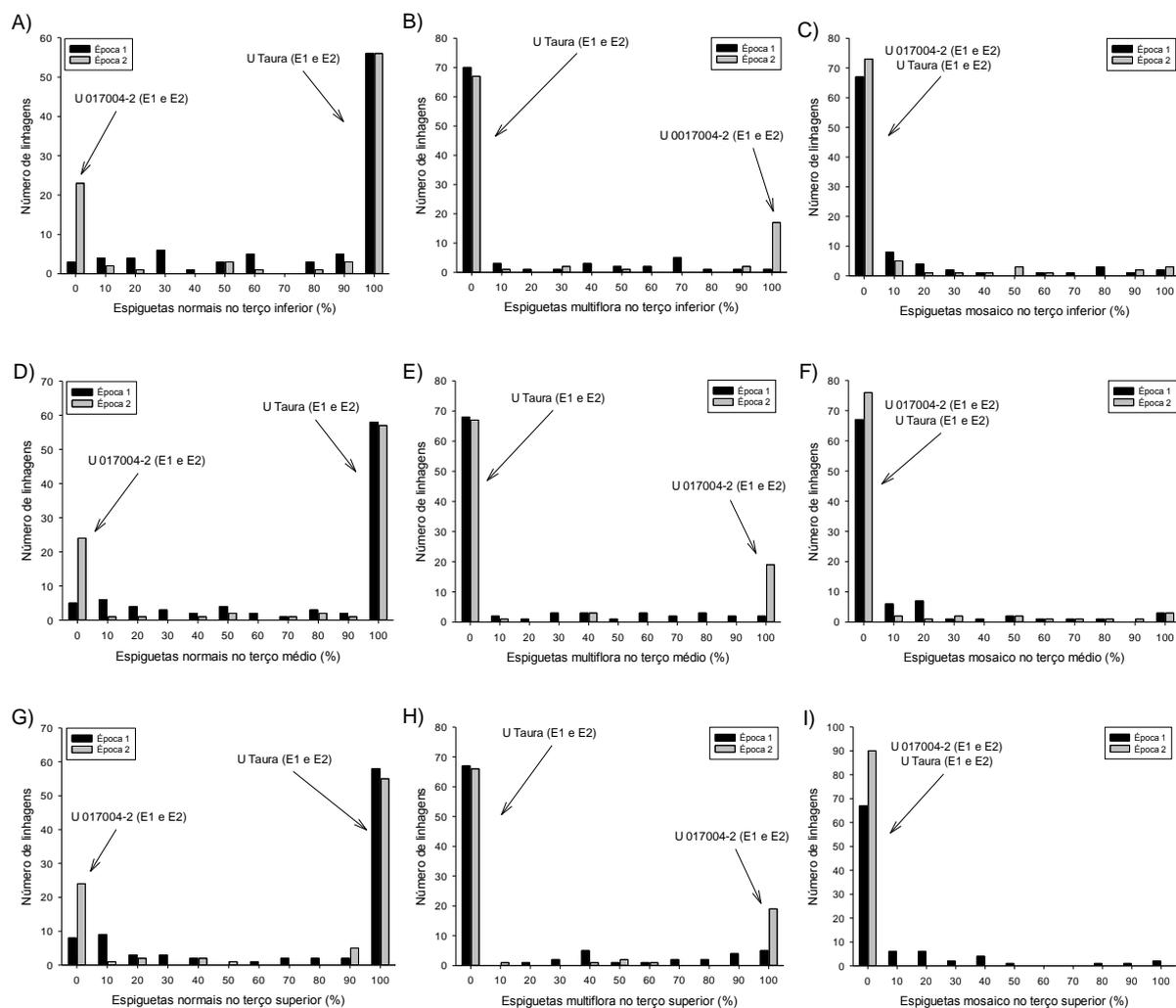


FIGURA 8. Distribuição de frequências das linhagens recombinantes de aveia derivadas do cruzamento entre URS Taura x UFRGS 017004-2 para fenótipos relacionados com o caráter espiguetas multiflora, em duas épocas de semeadura, no ano de 2014. As flechas indicam as classes que se encontram os genitores em cada época de semeadura. E1 = época 1 e E2 = época 2.

Aproximadamente 58 linhagens apresentaram 100% das espiguetas normais no terço médio da panícula, nas duas épocas de semeadura (Figura 8D). O desenvolvimento de espiguetas 100% multiflora no terço médio da panícula aumentou na segunda época de semeadura, com 19 linhagens em comparação

com a primeira época de semeadura que apresentou apenas duas linhagens (Figura 8E). A formação de espiguetas mosaico no terço médio da panícula apresentou distribuição de frequências similar entre as épocas de semeadura avaliadas, sendo que apenas três linhagens apresentaram o fenótipo 100% espiguetas mosaico. Por outro lado, 67 e 76 linhagens não apresentaram espiguetas com este fenótipo na primeira e na segunda época de semeadura, respectivamente. As linhagens com ausência absoluta de espiguetas mosaico nos terços inferior e médio foram muito similares nesta população (Figura 8C e 8F).

No terço superior da panícula, 58 e 55 linhagens apresentaram o fenótipo 100% das espiguetas normais na primeira e na segunda época de semeadura, respectivamente (Figura 8G). Para o fenótipo espiguetas multiflora, cinco e 19 linhagens apresentaram o fenótipo 100% espiguetas multiflora entre as duas épocas de semeadura avaliadas. É importante observar que o número de linhagens estáveis para a formação de espiguetas multiflora foi muito similar entre os diferentes terços da panícula, na segunda época de semeadura. Já para a primeira época de semeadura, o número de linhagens estáveis foi maior no terço superior em comparação com os demais (Figura 8H).

Em relação à formação das espiguetas mosaico, apenas duas linhagens apresentaram o fenótipo 100% espiguetas mosaico na primeira época de semeadura, enquanto nenhuma linhagem apresentou este fenótipo na segunda época de semeadura. O número de linhagens que não apresentou espiguetas mosaico no terço superior foi similar ao observado nos terços inferior e médio na primeira época de semeadura. Por outro lado, todas as linhagens (90) apresentaram a ausência deste fenótipo na segunda época de semeadura, portanto, número superior em comparação com os terços inferior e médio da panícula (Figura 8I).

A distribuição de frequências do caráter espiguetas multiflora, avaliado na população “URS Taura x UFRGS 017004-2”, considerando a panícula inteira, está apresentada na Figura 9. Aproximadamente 58 linhagens apresentaram 100% das espiguetas normais na panícula (Figura 9A). Na segunda época de semeadura, verificou-se o maior número de linhagens exibindo 100% de espiguetas multiflora (18 linhagens) quando comparado à primeira época de semeadura (duas linhagens) (Figura 9B).

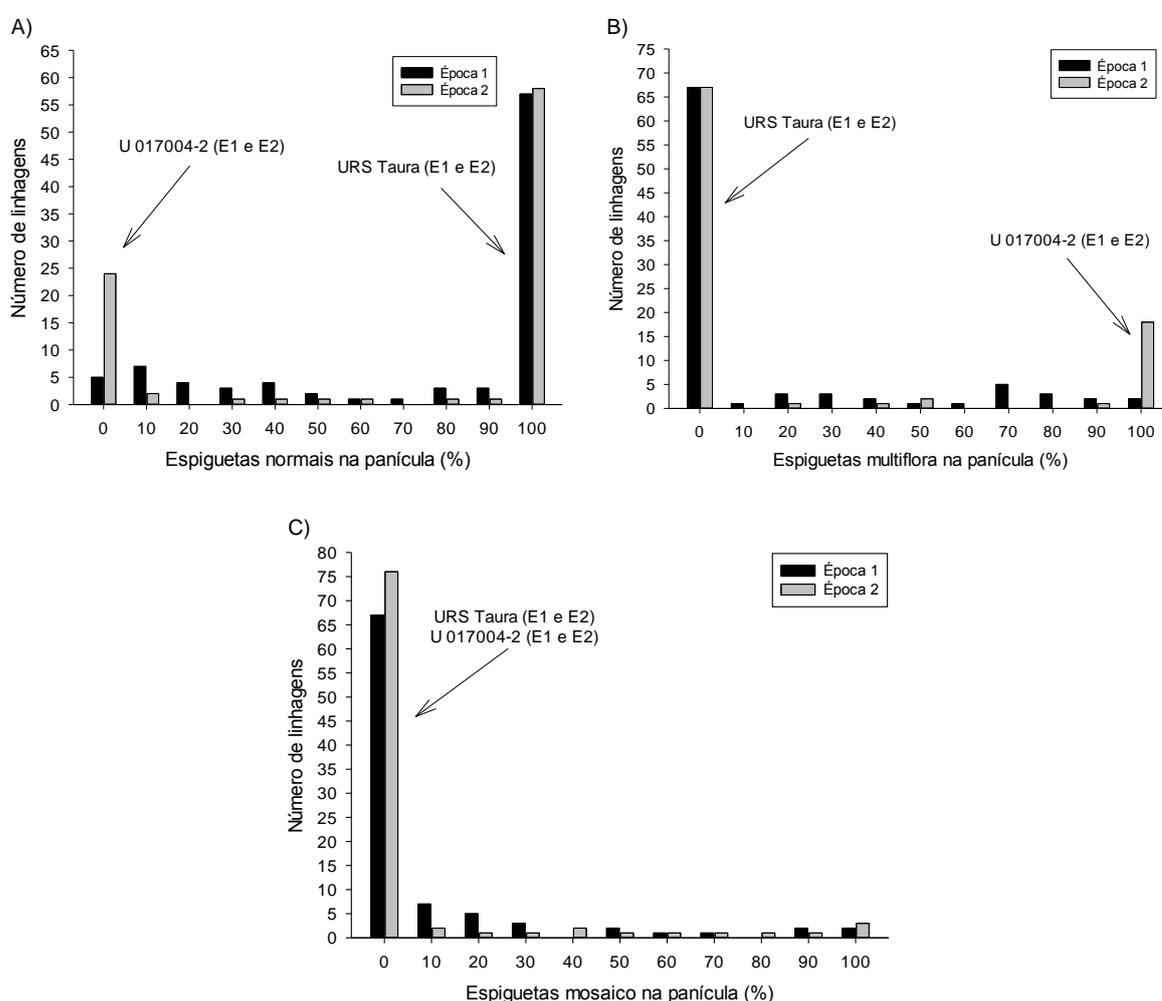


FIGURA 9. Distribuição de frequências das linhagens de aveia derivadas do cruzamento URS Taura x UFRGS 017004-2 para os fenótipos espiguetas normais, multiflora e mosaico, em duas épocas de semeadura, no ano de 2014. As flechas indicam as classes em que se encontram os genitores em cada época de semeadura. E1 = época 1 e E2 = época 2.

A distribuição de frequências para a formação de espiguetas mosaico indicou que o número de linhagens com 100% de espiguetas mosaico foi similar nas duas épocas de semeadura. Porém, o número de linhagens com ausência deste fenótipo foi superior na segunda época de semeadura (76 linhagens) em comparação com a primeira época de semeadura (67 linhagens) (Figura 9C).

A análise da distribuição de frequências revelou que as duas populações avaliadas apresentaram desempenho similar para o caráter espiguetas multiflora nas diferentes épocas de semeadura. Em ambas as populações o número de linhagens com o fenótipo 100% espiguetas multiflora foi superior na segunda época de semeadura, em todos os terços da panícula. Além disso, verificou-se a tendência de maior formação de espiguetas multiflora no terço superior da panícula na população “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1”. A população “URS Taura x UFRGS 017004-2” apresentou número superior de linhagens com panículas contendo 100% de espiguetas normais.

4.1.2.2 Análises de variância

Os resultados da análise de variância para o caráter espiguetas multiflora avaliado na população “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1” estão apresentados na Tabela 3. A análise de variância indicou efeito significativo para a interação genótipo x época de semeadura. Com exceção do fenótipo espiguetas normais no terço superior da panícula (ENTs), todos os outros fenótipos relacionados ao caráter espiguetas multiflora foram dependentes da época de semeadura (Tabela 3).

A formação de espiguetas multiflora aumentou nos três terços da panícula analisados na segunda época de semeadura, enquanto a formação de espiguetas mosaico diminuiu. Embora a ocorrência de espiguetas normais no terço superior

da panícula não tenha sido associada com a época de semeadura, a expressão deste fenótipo foi reduzida nos terços inferior e médio da panícula na segunda época de semeadura. Os elevados coeficientes de variação estimados, principalmente para os fenótipos espiguetas multiflora e mosaico, em ambos os terços da panícula, foram decorrentes da expressividade variável do caráter espiguetas multiflora e do número reduzido de repetições.

TABELA 3. Resumo da análise de variância para os fenótipos espiguetas normais (ENTi), espiguetas multiflora (EMTi) e espiguetas mosaico (EMSTi) no terço inferior; espiguetas normais (ENTm), espiguetas multiflora (EMTm) e espiguetas mosaico (EMSTm) no terço médio; espiguetas normais (ENTs), espiguetas multiflora (EMTs) e espiguetas mosaico (EMSTs) no terço superior, em duas épocas de semeadura, na população UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1.

Causas de variação	GL	UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006030-1								
		Quadrado Médio								
		ENTi	EMTi	EMSTi	ENTm	EMTm	EMSTm	ENTs	EMTs	EMSTs
Blocos/E	2	250,6	525,9	1268,4	255,3	1042,5	1547,6	268,1	1104,5	1129,8
Genótipos (G)	95	7202,4**	1979,3**	4756,1**	7471,7**	2577,8**	4128,6**	8317,9**	4379,8**	2534,3**
Épocas (E)	1	17264,8 [†]	45075,4 [†]	6547,1 ^{ns}	12936,6 [†]	41206,4 [†]	7966,3 ^{ns}	3346,2 ^{ns}	32731,6 [†]	15146,8 ^{ns}
G x E	95	560,0**	1068,6**	541,3 [†]	407,4 [†]	845,1**	538,0**	126,4 ^{ns}	517,2**	484,2**
Resíduo	190	336,0	166,8	373,2	283,4	126,7	287,5	227,4	156,9	201,5
Média E1	-	66,0	3,8	30,2	63,9	7,7	28,4	57,8	18,2	24,0
Média E2	-	52,6	25,4	22,0	52,3	28,4	19,3	51,9	36,6	11,5
CV E1	-	30,3	237,5	62,3	27,3	117,7	60,7	24,4	62,1	63,3
CV E2	-	31,3	62,6	90,2	31,0	46,1	86,1	30,9	37,3	113,9

* e ** = significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; ^{ns} = não significativo; GL = graus de liberdade; E1 = época 1 e E2 = época 2; CV = coeficiente de variação (%).

A análise de variância do caráter espiguetas multiflora, considerando a panícula inteira para a população “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1” está apresentada na Tabela 4. Os resultados indicaram efeito significativo da interação genótipo x época de semeadura para os fenótipos espiguetas multiflora (EMULT) e espiguetas mosaico (EMOS). Estes resultados reafirmaram o aumento na

percentagem de espiguetas multiflora e a redução na percentagem de espiguetas mosaico na segunda época de semeadura (Tabela 4).

TABELA 4. Resumo da análise de variância para os fenótipos espiguetas normais (ENOR), espiguetas multiflora (EMULT) e espiguetas mosaico (EMOS), em duas épocas de semeadura, para a população UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1.

Causas de variação	GL	UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006030-1		
		ENOR	EMULT	EMOS
Blocos/E	2	239,5	955,7	1510,9
Genótipos (G)	95	7663,2 ^{**}	2881,4 ^{**}	3701,2 ^{**}
Épocas (E)	1	9632,3 [*]	38008,1 [*]	9372,6 ^{ns}
G x E	95	294,1 ^{ns}	683,0 ^{**}	464,7 ^{**}
Resíduo	190	253,7	111,5	235,6
Média E1	-	62,3	10,2	27,5
Média E2	-	52,2	30,1	17,6
CV E1	-	25,3	82,3	57,2
CV E2	-	30,8	41,0	84,7

* e ** = significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; ^{ns} = não significativo; GL = graus de liberdade; E1 = época 1 e E2 = época 2; CV = coeficiente de variação (%).

Os resultados da análise de variância para o caráter espiguetas multiflora avaliado na população “URS Taura x UFRGS 017004-2” estão apresentados na Tabela 5. Com exceção dos fenótipos espiguetas mosaico, em todos os terços da panícula, e espiguetas normais no terço médio da panícula (ENTm), todos os outros fenótipos relacionados à formação de espiguetas normais e multiflora apresentaram interação significativa entre os genótipos e as épocas de semeadura (Tabela 5).

A formação de espiguetas multiflora aumentou na segunda época de semeadura, independente do terço da panícula avaliado, na população “URS Taura x UFRGS 017004-2”. A ocorrência de espiguetas mosaico se manteve

muito similar entre as épocas de semeadura, enquanto a formação de espiguetas normais diminuiu na segunda época de semeadura. Da mesma forma que na população “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1”, os coeficientes de variação foram elevados, principalmente para a formação de espiguetas multiflora e mosaico (Tabela 5).

TABELA 5. Resumo da análise de variância para os fenótipos espiguetas normais (ENTi), espiguetas multiflora (EMTi) e espiguetas mosaico (EMSTi) no terço inferior; espiguetas normais (ENTm), espiguetas multiflora (EMTm) e espiguetas mosaico (EMSTm) no terço médio; espiguetas normais (ENTs), espiguetas multiflora (EMTs) e espiguetas mosaico (EMSTs) no terço superior, em duas épocas de semeadura, na população URS Taura x UFRGS 017004-2.

Causas de variação	GL	URS Taura x UFRGS 017004-2								
		Quadrado Médio								
		ENTi	EMTi	EMSTi	ENTm	EMTm	EMSTm	ENTs	EMTs	EMSTs
Blocos/E	2	3,2	38,2	31,5	9,6	2,3	16,3	54,5	10,8	95,6
Genótipos (G)	95	5775,1**	4103,3**	2229,7**	6205,8**	4545,2**	2166,2**	6793,3**	5278,6**	1877,4**
Épocas (E)	1	7972,0**	9959,7**	110,5 ^{ns}	6239,0**	7135,2**	30,1 ^{ns}	3400,2*	3493,6**	0,6 ^{ns}
G x E	95	355,2**	479,9**	154,3 ^{ns}	291,8*	379,7**	179,1 ^{ns}	209,8 ^{ns}	207,3**	219,3 ^{ns}
Resíduo	190	214,4	126,0	167,7	214,7	120,1	194,9	201,5	116,2	167,2
Média E1	-	76,8	12,2	11,0	75,2	14,2	10,6	73,0	17,4	9,6
Média E2	-	67,7	22,4	9,9	67,2	22,8	10,0	67,0	23,5	9,5
CV E1	-	18,5	96,0	101,6	16,2	76,4	104,0	18,0	63,4	116,3
CV E2	-	22,3	47,8	146,6	25,0	48,5	163,9	22,7	44,7	152,6

* e ** = significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; ^{ns} = não significativo; E1 = época 1 e E2 = época 2; CV = coeficiente de variação (%).

A análise de variância das espiguetas normais, multiflora e mosaico em toda a panícula, sem considerar a divisão entre os terços, também foi realizada para a população “URS Taura x UFRGS 017004-2” (Tabela 6). Os resultados indicaram efeito significativo da interação genótipo x época de semeadura apenas para o fenótipo EMULT. A formação de espiguetas multiflora aumentou na segunda época de semeadura, reafirmando os resultados considerando os

diferentes terços da panícula. Diferentemente do que foi observado para a população “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1”, este aumento não esteve acompanhado da redução na percentagem de espiguetas mosaico (Tabela 6).

TABELA 6. Resumo da análise de variância para os fenótipos espiguetas normais (ENOR), espiguetas multiflora (EMULT) e espiguetas mosaico (EMOS), em duas épocas de semeadura, para a população URS Taura x UFRGS 017004-2.

Causas de variação	GL	URS Taura x UFRGS 017004-2		
		Quadrado Médio		
		ENOR	EMULT	EMOS
Blocos/E	2	27,0	10,1	55,1
Genótipos (G)	95	6291,9**	4684,0**	2041,1**
Épocas (E)	1	5355,8**	6144,3**	27,1 ^{ns}
G x E	95	241,3 ^{ns}	317,8**	171,6 ^{ns}
Resíduo	190	194,7	114,6	166,9
Média E1	-	74,8	15,0	10,2
Média E2	-	67,3	23,0	9,7
CV E1	-	16,1	71,7	101,2
CV E2	-	23,2	46,6	154,0

* e ** = significativo a 5% e 1% de probabilidade pelo teste F, respectivamente; ^{ns} = não significativo; GL = graus de liberdade; E1 = época 1 e E2 = época 2; CV = coeficiente de variação (%).

Comparando a duas populações, verifica-se que ambas aumentaram a formação de espiguetas multiflora na segunda época de semeadura, em todos os terços da panícula (Tabela 3 e Tabela 5). Na população “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1”, este aumento esteve acompanhado da redução das espiguetas mosaico, em cada um dos três terços (Tabela 3). Considerando toda a panícula, apenas as espiguetas multiflora apresentaram interação significativa entre os genótipos e as épocas de semeadura, independente da população estudada (Tabela 4 e Tabela 6). Apenas a população “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1” apresentou interação significativa para a formação de

espiguetas mosaico, sendo que a expressão deste fenótipo diminuiu na segunda época de semeadura (Tabela 6).

4.1.2.3 Comparação de médias

A comparação de médias entre as épocas de semeadura dos genitores UFRGS 01B7114-1-3 e UFRGS 006013-1, para os fenótipos espiguetas normais, espiguetas multiflora e espiguetas mosaico, nos diferentes terços da panícula e na panícula inteira, está apresentada na Tabela 7. O genitor UFRGS 01B7114-1-3 apresentou o mesmo desempenho entre as épocas de semeadura para o caráter espiguetas multiflora, com produção de 100% das espiguetas normais nas suas panículas (Tabela 7).

TABELA 7. Comparação de médias dos genitores UFRGS 01B7114-1-3 e UFRGS 006013-1, entre as épocas de semeadura, para os fenótipos espiguetas normais (ENTi), espiguetas multiflora (EMTi) e espiguetas mosaico (EMSTi) no terço inferior; espiguetas normais (ENTm), espiguetas multiflora (EMTm) e espiguetas mosaico (EMSTm) no terço médio; espiguetas normais (ENTs), espiguetas multiflora (EMTs) e espiguetas mosaico (EMSTs) no terço superior; espiguetas normais (ENOR), espiguetas multiflora (EMULT) e espiguetas mosaico (EMOS) em toda a panícula.

População	Espiguetas	ENTi		EMTi		EMSTi	
		E1	E2	E1	E2	E1	E2
UFRGS 01B7114-1-3	Normal	100,0 A	100,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A
UFRGS 006013-1	Multiflora/Mosaico	5,6 A	1,1 A	1,2 B	82,2 A	93,2 A	16,7 B
População	Espiguetas	ENTm		EMTm		EMSTm	
		E1	E2	E1	E2	E1	E2
UFRGS 01B7114-1-3	Normal	100,0 A	100,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A
UFRGS 006013-1	Multiflora/Mosaico	4,9 A	0,0 A	18,0 B	89,7 A	77,1 A	10,3 B
População	Espiguetas	ENTs		EMTs		EMSTs	
		E1	E2	E1	E2	E1	E2
UFRGS 01B7114-1-3	Normal	100,0 A	100,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A
UFRGS 006013-1	Multiflora/Mosaico	6,1 A	7,4 A	48,7 B	83,3 A	45,2 A	9,3 B
População	Espiguetas	ENOR		EMULT		EMOS	
		E1	E2	E1	E2	E1	E2
UFRGS 01B7114-1-3	Normal	100,0 A	100,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A
UFRGS 006013-1	Multiflora/Mosaico	5,4 A	1,9 A	21,1 B	85,5 A	73,5 A	12,6 B

Médias seguidas pelas mesmas letras na horizontal não diferem estatisticamente (entre épocas de semeadura); E1 = época 1 e E2 = época 2.

O genitor UFRGS 006013-1, que possui expressividade variável em relação à formação das espiguetas, aumentou a formação de espiguetas multiflora em todos os terços da panícula na segunda época de semeadura. Este aumento esteve acompanhado da redução das espiguetas mosaico (Tabela 7). Os resultados obtidos para a formação de espiguetas normais, considerando toda a panícula, reafirmam que o genitor UFRGS 01B7114-1-3 foi totalmente estável para a formação de espiguetas normais. Da mesma forma que descrito anteriormente, o genitor UFRGS 006013-1 aumentou o número de espiguetas multiflora e reduziu o número de espiguetas mosaico, considerando toda a panícula, na segunda época de semeadura (Tabela 7).

A comparação de médias entre as épocas de semeadura dos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2, para os fenótipos espiguetas normais, espiguetas multiflora e espiguetas mosaico, nos diferentes terços da panícula e na panícula inteira, está apresentada na Tabela 8. O genitor URS Taura apresentou apenas espiguetas normais, independente do terço da panícula analisado e da época de semeadura. Por outro lado, o genitor UFRGS 017004-2 apresentou elevada proporção de espiguetas multiflora nas suas panículas, sendo que este fenótipo não foi alterado em função da época de semeadura (Tabela 8).

Analisando a comparação de médias dos genitores de cada população, verifica-se que os genitores com espiguetas normais (UFRGS 01B7114-1-3 e URS Taura) apresentaram desempenho similar em função das épocas de semeadura. No entanto, os genitores com espiguetas multiflora (UFRGS 006013-1 e UFRGS 017004-2) tiveram respostas diferentes em relação à alteração da época de semeadura. O genitor UFRGS 006013-1 apresentou expressividade variável para a formação das espiguetas, tendo aumentado a ocorrência de espiguetas multiflora e reduzido a formação de espiguetas mosaico na segunda

época de semeadura (Tabela 7). Por outro lado, o genitor UFRGS 017004-2 apresentou elevada proporção de espiguetas multiflora nas suas panículas, sendo que a formação deste fenótipo não variou em função da época de semeadura. Além disso, o genitor UFRGS 017004-2 indicou a ausência de espiguetas mosaico em suas panículas (Tabela 8).

TABELA 8. Comparação de médias entre os genitores URS Taura e UFRGS 017004-2, entre as épocas de semeadura, para os fenótipos espiguetas normais (ENTi), espiguetas multiflora (EMTi) e espiguetas mosaico (EMSTi) no terço inferior; espiguetas normais (ENTm), espiguetas multiflora (EMTm) e espiguetas mosaico (EMSTm) no terço médio; espiguetas normais (ENTs), espiguetas multiflora (EMTs) e espiguetas mosaico (EMSTs) no terço superior; espiguetas normais (ENOR), espiguetas multiflora (EMULT) e espiguetas mosaico (EMOS) em toda a panícula.

Genitor	Espiguetas	ENTi		EMTi		EMSTi	
		E1	E2	E1	E2	E1	E2
URS Taura	Normal	100,0 A	100,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A
UFRGS 017004-2	Multiflora/Mosaico	5,8 A	0,0 A	94,2 A	100,0 A	0,0 A	0,0 A
Genitor	Espiguetas	ENTm		EMTm		EMSTm	
		E1	E2	E1	E2	E1	E2
URS Taura	Normal	100,0 A	100,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A
UFRGS 017004-2	Multiflora/Mosaico	4,7 A	0,0 A	95,3 A	100,0 A	0,0 A	0,0 A
Genitor	Espiguetas	ENTs		EMTs		EMSTs	
		E1	E2	E1	E2	E1	E2
URS Taura	Normal	100,0 A	100,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A
UFRGS 017004-2	Multiflora/Mosaico	1,8 A	0,0 A	98,2 A	100,0 A	0,0 A	0,0 A
Genitor	Espiguetas	ENOR		EMULT		EMOS	
		E1	E2	E1	E2	E1	E2
URS Taura	Normal	100,0 A	100,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A	0,0 A
UFRGS 017004-2	Multiflora/Mosaico	3,8 A	0,0 A	96,2 A	100,0 A	0,0 A	0,0 A

Médias seguidas pelas mesmas letras na horizontal não diferem estatisticamente (entre épocas de semeadura); E1 = época 1 e E2 = época 2.

4.1.2.4 Análise de regressão da expressão do caráter espiguetas multiflora entre as duas épocas de semeadura

A análise de regressão incluindo apenas o fenótipo espiguetas multiflora na população “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1”, em função da época de semeadura, nos diferentes terços da panícula, está apresentada na Figura 10.

Esta análise foi conduzida com o propósito de determinar o efeito ambiental distinto entre épocas de semeadura sobre a formação de espiguetas multiflora, nos diferentes terços da panícula. Embora, o teste F tenha indicado uma equação de regressão linear significativa para a formação de espiguetas multiflora no terço inferior, observa-se uma ampla dispersão das linhagens avaliadas entre as épocas. Neste terço, o modelo indica que para cada espiguetas multiflora formada na primeira época de semeadura há um incremento de 2,07 espiguetas multiflora formadas na segunda época (Figura 10A).

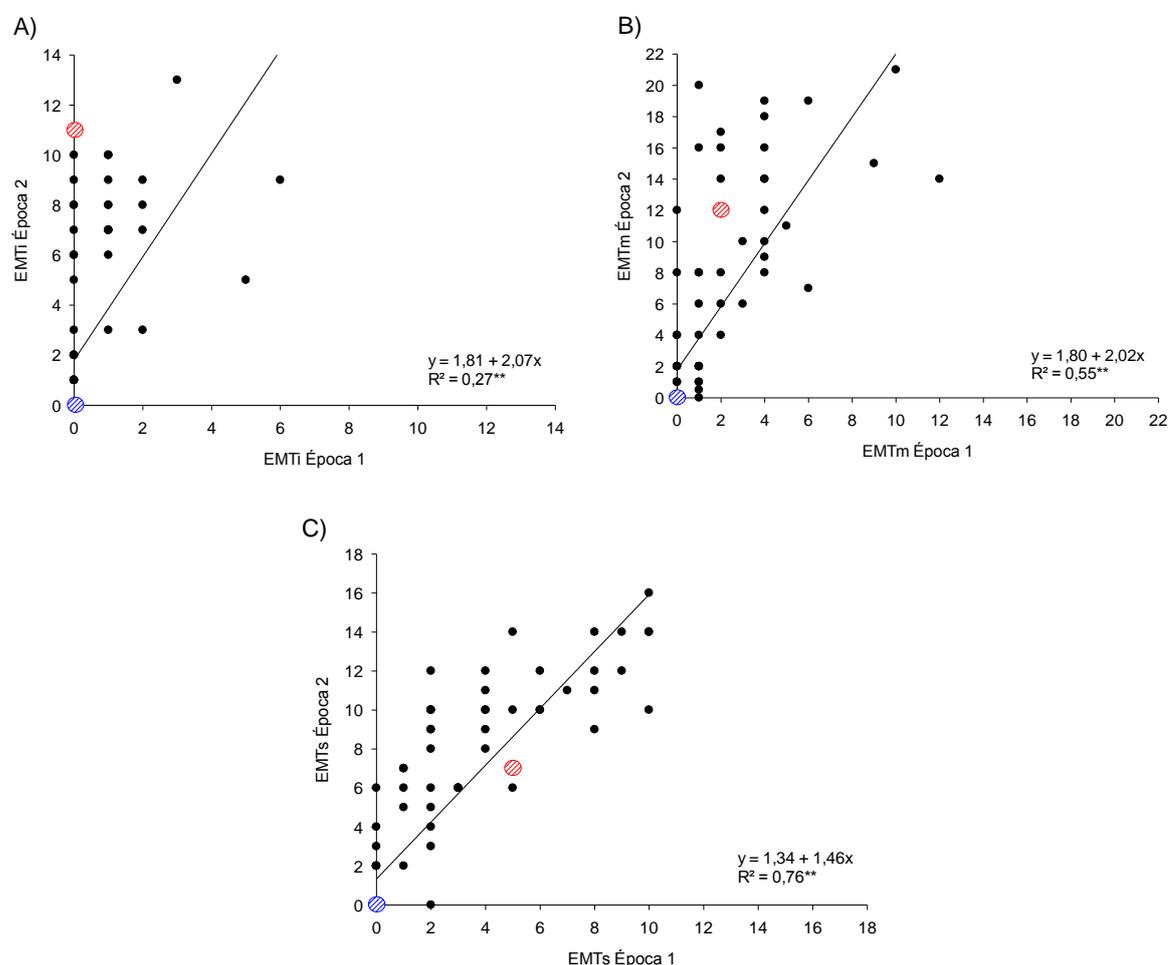


FIGURA 10. Regressão linear para espiguetas multiflora no terço inferior – EMTi (A), terço médio – EMTm (B) e terço superior – EMTs (C) em função da época de semeadura, na população UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1. Legenda: pontos pretos = linhagens recombinantes; ponto maior de coloração azul = UFRGS 01B7114-1-3; ponto maior de coloração vermelha = UFRGS 006013-1.

Analisando o terço médio da panícula, verificou-se uma menor dispersão das linhagens e um incremento similar (2,02) no número de espiguetas multiflora neste terço em comparação com o terço inferior da panícula (Figura 10B). O coeficiente de determinação (R^2) obtido para o terço superior apresentou maior magnitude ($R^2 = 0,76^{**}$) em comparação com os terços inferior e médio da panícula. Além disso, foi observado a menor dispersão das linhagens e o menor incremento (1,46) na formação de espiguetas multiflora entre as épocas de semeadura (Figura 10C). Estes resultados indicaram que a expressividade variável do caráter espiguetas multiflora nas linhagens desta população foi mais acentuada nos terços inferior e médio da panícula, em função das variações ambientais.

A análise de regressão para a população “URS Taura x UFRGS 017004-2”, considerando o fenótipo espiguetas multiflora nos diferentes terços da panícula, está apresentada na Figura 11. Coeficientes de regressão lineares positivos também foram identificados nesta população, para cada terço da panícula. Estes coeficientes de regressão indicaram que o número de espiguetas multiflora aumentou de forma linear na segunda época de semeadura (Figura 11).

O valor do R^2 foi de 0,66, 0,82 e 0,85, para os terços inferior, médio e superior da panícula, respectivamente. Nestes terços, um incremento de 1,57, 1,45 e 1,08 no número de espiguetas multiflora foi observado na segunda época de semeadura em comparação com a primeira época de semeadura (Figura 11). A análise de regressão das duas populações indicou desempenho similar em relação ao caráter espiguetas multiflora em função das épocas de semeadura. No entanto, a população “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1” indicou maior expressividade variável, principalmente nos terços inferior e médio da panícula.

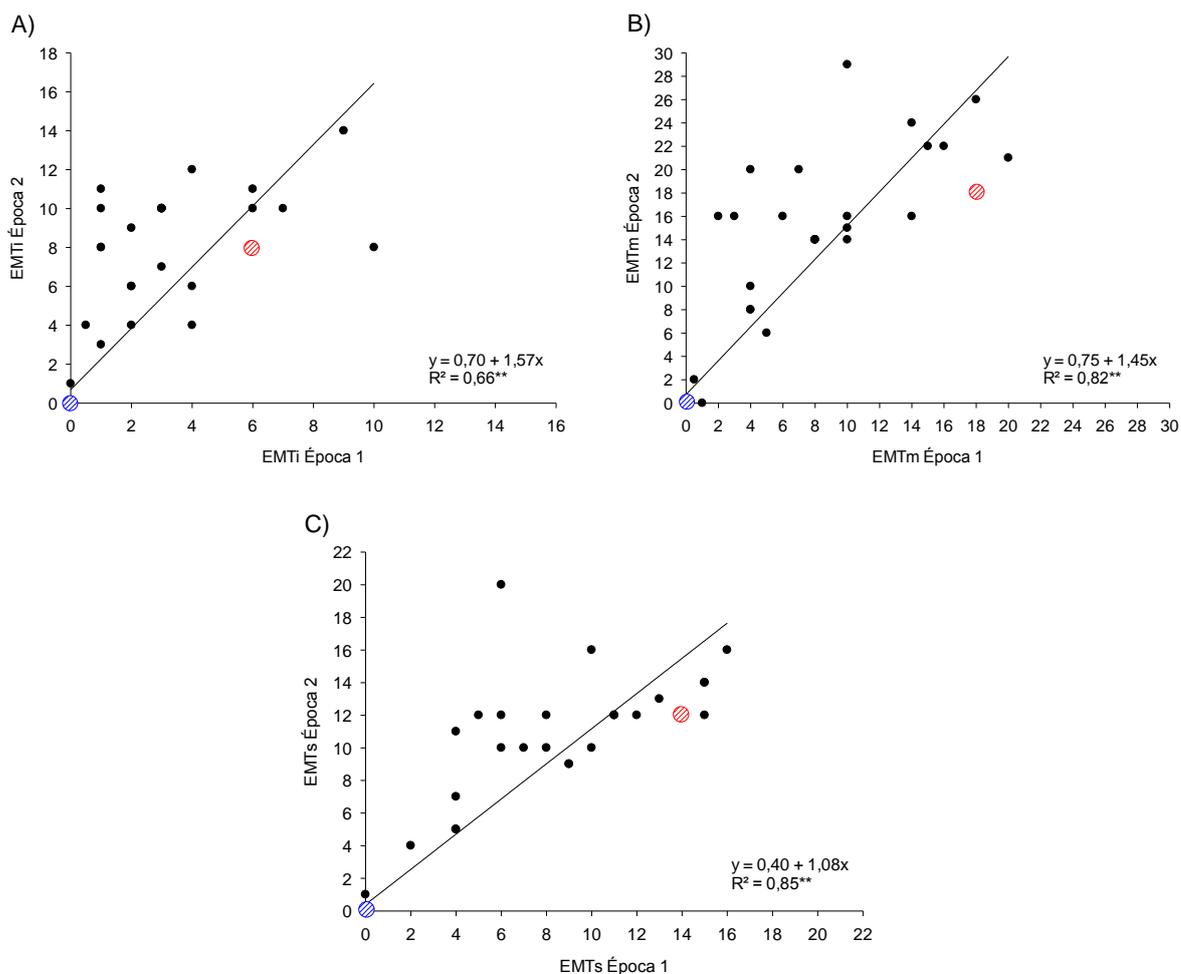


FIGURA 11. Regressão linear para espiguetas multiflora no terço inferior – EMTi (A), terço médio – EMTm (B) e terço superior – EMTs (C) em função da época de semeadura, na população URS Taura x UFRGS 017004-2. Legenda: pontos pretos = linhagens recombinantes; ponto maior de coloração azul = URS Taura; ponto maior de coloração vermelha = UFRGS 017004-2.

4.2 Análise genética do caráter espiguetas multiflora em aveia

A análise genética do caráter espiguetas multiflora foi realizada para as populações “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1” e “URS Taura x UFRGS 017004-2”, nas duas épocas de semeadura avaliadas. Foram consideradas 92 e 90 linhagens em cada população avaliada, respectivamente.

4.2.1 População “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1”

Na primeira época de semeadura foi observado que 45 linhagens apresentaram 100% de espiguetas normais na panícula (determinadas), enquanto 47 linhagens apresentaram os fenótipos espiguetas multiflora e/ou mosaico na mesma panícula (indeterminadas). Na segunda época de semeadura, a proporção observada foi muito similar à primeira época de semeadura. Um total de 44 linhagens apresentou apenas espiguetas normais nas panículas, enquanto 48 linhagens apresentaram os fenótipos espiguetas multiflora e/ou mosaico na mesma panícula (Tabela 9).

TABELA 9. Teste de qui-quadrado (χ^2) das proporções fenotípicas observadas e esperadas na população “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1”, em duas épocas de semeadura, considerando o modelo de um gene controlando o caráter espiguetas multiflora em aveia.

População	Primeira época		Segunda época	
	Indeterminadas	Determinadas	Indeterminadas	Determinadas
UFRGS 01B7114-1-3	-	1	-	1
UFRGS 006013-1	1	-	1	-
Frequência observada	47	45	48	44
Frequência esperada	46	46	46	46
Teste de qui-quadrado (χ^2)	0,04*		0,17*	
Probabilidade	0,83		0,68	

*Significativo pelo teste de qui-quadrado a 5% de probabilidade ($\chi^2_{0,05(1)} = 3,841$).

Considerando que as 92 linhagens avaliadas em cada época de semeadura apresentavam elevada proporção de locos gênicos em homozigose e a hipótese genética de um único gene controlando o caráter espiguetas multiflora, a proporção fenotípica esperada foi de 1:1 (uma linhagem indeterminada:uma linhagem determinada). O valor de qui-quadrado teórico, considerando 5% de probabilidade de erro e um grau de liberdade, é 3,841. O valor de qui-quadrado

calculado para a primeira e segunda época de semeadura foi 0,04 (probabilidade = 0,83) e 0,17 (probabilidade = 0,68), respectivamente (Tabela 9). Como os valores de qui-quadrado calculados foram menores do que o valor teórico (3,841), a hipótese de que um gene controla o caráter espiguetas multiflora nesta população não pode ser rejeitada.

4.2.2 População “URS Taura x UFRGS 017004-2”

Na primeira época de semeadura foi observado que 50 linhagens apresentaram o fenótipo 100% espiguetas normais (determinadas), enquanto 40 linhagens apresentaram os fenótipos espiguetas multiflora e/ou mosaico (indeterminadas). Na segunda época de semeadura, a proporção observada foi muito similar à primeira época de semeadura. Um total de 51 linhagens apresentou apenas espiguetas normais nas panículas, enquanto 39 linhagens apresentaram os fenótipos espiguetas multiflora e/ou mosaico na mesma panícula (Tabela 10).

TABELA 10. Teste de qui-quadrado (χ^2) das proporções fenotípicas observadas e esperadas na população “URS Taura x UFRGS 017004-2”, em duas épocas de semeadura, considerando o modelo de um gene controlando o caráter espiguetas multiflora em aveia.

População	Primeira época		Segunda época	
	Indeterminadas	Determinadas	Indeterminadas	Determinadas
URS Taura	-	1	-	1
UFRGS 017004-2	1	-	1	-
Frequência observada	40	50	39	51
Frequência esperada	45	45	45	45
Teste de qui-quadrado (χ^2)	1,11*		1,60*	
Probabilidade	0,29		0,21	

*Significativo pelo teste de qui-quadrado a 5% de probabilidade ($\chi^2_{0,05(1)} = 3,841$).

Considerando que as 90 linhagens avaliadas em cada época de semeadura encontravam-se com elevada proporção de locos gênicos em homozigose, bem como a hipótese de um gene controlando o caráter espiguetas multiflora, a proporção fenotípica esperada foi de 1:1 (uma linhagem indeterminada:uma linhagem determinada). O valor de qui-quadrado teórico, considerando 5% de probabilidade e um grau de liberdade, é 3,841. O valor de qui-quadrado calculado para a primeira e segunda época de semeadura foi 1,11 (probabilidade = 0,29) e 1,60 (probabilidade = 0,21), respectivamente (Tabela 10). Como os valores de qui-quadrado calculados foram menores do que o valor teórico (3,841), a hipótese de que um gene controla a expressão do caráter espiguetas multiflora nesta população não pode ser rejeitada.

Os resultados da análise genética nas duas populações estudadas indicaram que a herança do caráter espiguetas multiflora foi determinada por um único gene, independente da população e da época de semeadura avaliada. Estudos recentes buscando identificar fatores genéticos e moleculares associados com a diferenciação dos meristemas e com o número de estruturas florais tem sido realizados. Com base nas informações disponíveis na literatura até o momento, genes como *AP1*, *AP2* e *AGL6* exercem importantes funções na determinação das estruturas florais. Desta forma, os resultados obtidos neste estudo para estes genes candidatos ao controle do caráter espiguetas multiflora em aveia serão apresentados a seguir.

4.3 Análise molecular do caráter espiguetas multiflora em aveia

A análise molecular do caráter espiguetas multiflora consistiu na identificação, clonagem e sequenciamento de genes candidatos ao controle deste

entre as sequências “b” dos genitores, em uma região exônica do gene. Quando a sequência “a” dos genitores foi analisada, ambas apresentaram o nucleotídeo timina na posição 144. Nesta mesma posição da sequência “b”, o genitor UFRGS 017004-2 (U01b) apresenta o nucleotídeo timina, enquanto o genitor URS Taura (UTAb) apresenta o nucleotídeo guanina. Também foram identificados 12 marcadores SNP entre as sequências clonadas de aveia quando alinhadas com a sequência de trigo (acesso AY747600.1), nas regiões codificantes (Figura 12).

A sequência “b” do genitor UFRGS 017004-2 apresenta 96% de identidade com a sequência do gene *Vrn1* de aveia cultivada (acesso HQ910529.1). Aproximadamente um terço da sequência “b” do genitor UFRGS 017004-2 é 100% idêntica à sequência do gene *FRUITFULL (FUL)* de aveia (acesso DQ792965.1). A sequência “b” do genitor URS Taura apresenta 99% de identidade com os genes *Vrn1* (acesso HQ910529.1) e *FUL* (acesso DQ792965.1). Além disso, a sequência “b” do genitor URS Taura apresenta 80% de identidade com a sequência do gene *Vrn1-D1* de *Triticum aestivum* (acesso AY747602.1) e 81% de identidade com as sequências do gene *Vrn1-B1* de *Triticum durum* (acesso JN817431.1), *Triticum spelta* (acesso AY055112.1) e *Triticum turgidum* (acesso AY747602.1).

O SNP entre as sequências “b”, na posição 144 da região que corresponde ao quarto éxon, alterou a sequência de aminoácidos no polipeptídeo sintetizado entre os genitores URS Taura e UFRGS 017004-2. O nucleotídeo timina localizado na posição 144 do genitor UFRGS 017004-2 faz parte do códon GAU, o qual especifica a adição do aminoácido ácido aspártico (D) ao polipeptídeo sintetizado. Nesta mesma posição, a presença do nucleotídeo guanina no genitor URS Taura faz parte do códon GAG, especificando para a adição do aminoácido

ácido glutâmico (E) ao polipeptídeo sintetizado, da mesma forma que ocorre em trigo (acesso AY747600.1) (Figura 13).

	*	20	*	
U01b	:	HLMGDDLESNLKELQQLEQQLESSLKHRSRK	:	33
UTAb	:	HLMGEDLESNLKELQQLEQQLESSLKHRSRK	:	33
Trigo	:	HLMGEDLESNLKELQQLEQQLESSLKHRSRK	:	33

FIGURA 13. Alinhamento das sequências de aminoácidos correspondente ao quarto éxon do gene *Vrn1* amplificadas pelo par de primers Ver-1.18. Legenda: U01b (sequência “b” de UFRGS 017004-2); UTAAb (sequência “b” de URS Taura) e Trigo (acesso AY747600.1).

4.3.2 APETALA2

De todas as combinações de *primers* testadas para o gene *AP2* em aveia, apenas o par de *primers* Ap2.7 amplificou fragmentos com tamanho similar às sequências utilizadas para o desenvolvimento dos *primers*. Duas sequências candidatas ao gene *AP2* em aveia foram identificadas nos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2, denominadas “x” e “y”. A sequência “x” dos genitores foi alinhada à sequência do gene *AP2* derivada de *Brachypodium distachyon*. Este alinhamento está apresentado na Figura 14.

A sequência “x” dos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2 apresentou elevada similaridade de nucleotídeos entre si e também com a sequência do gene *AP2* de *Brachypodium distachyon*. A similaridade entre aveia e *Brachypodium distachyon* ocorre principalmente na região que corresponde ao quinto éxon. No entanto, esta região corresponde a uma sequência curta e representada por aproximadamente 20 nucleotídeos (Figura 14). A sequência “x” dos genitores analisados foi convertida para RNA mensageiro e comparada com a sequência do *miR172a* de *Brachypodium distachyon*, disponível no banco público de dados de sequências e anotação de microRNAs miRBase (<http://www.mirbase.org>).

uma guanina, enquanto o genitor URS Taura não possui nenhum nucleotídeo nesta posição. Da mesma forma, na posição 921 o genitor URS Taura apresenta uma citosina, enquanto o genitor UFRGS 017004-2 não possui nenhum nucleotídeo nesta mesma posição (Figura 15). Para verificar se a ocorrência destes SNPs alterou a sequência de aminoácidos, a tradução das sequências de nucleotídeos foi realizada.

A ocorrência dos SNPs altera a sequência de aminoácidos dos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2 (Figura 16). A presença da adenina na posição 671 codifica o aminoácido glutamina no genitor UFRGS 017004-2, enquanto a presença de uma citosina nesta mesma posição codifica o aminoácido prolina em URS Taura (Figura 16).

```

                *           20           *           40           *           60
U017004-2 : MAFVMPPPRQLAPTVGLAALAVVKIRMGDIFGTSERVVSGLVQRFGALDYVSDNTGSFGRNPPPRNG : 67
UTaura    : MAFVMPPPRQLAPTVGLAALAVVKIRMGDIFGTSERVVSGLVQRFGALDYVSDNTGSFGRNPPPRNG : 67

                *           80           *
U017004-2 : LFIKLGVHKGLCwHR*VLR*TSATCRPRSQL : 96
UTaura    : LFIKLGVHKVYVVGIDESYVHLRHVVPRSQ- : 96

```

FIGURA 16. Alinhamento das sequências de aminoácidos correspondente à possível proteína codificada pelo gene *AP2* em aveia. Regiões marcadas em preto indicam conservação entre as sequências de aminoácidos. A presença do asterisco entre os aminoácidos R e V indicou a existência de um códon de terminação.

A partir do *indel* na posição 872 (Figura 15), a sequência de aminoácidos dos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2 torna-se completamente distinta, como pode ser visualizado a partir da posição 77 na Figura 16. A ocorrência deste mesmo *indel* faz com que a sequência de aminoácidos do genitor UFRGS 017004-2 seja interrompida precocemente devido ao códon de terminação da tradução UGA (Opala), situado entre as posições 889 e 891 (Figura 15) e na posição 83 representado pelo asterisco na Figura 16. Assim, a proteína do genitor UFRGS 017004-2 torna-se truncada quando comparada com a proteína do

genitor URS Taura. A ausência da guanina na posição 872 evita a ocorrência deste códon de terminação no genitor URS Taura (Figura 15). Para estudar a conformação da proteína sintetizada pelo gene *AP2 in vivo*, a estrutura tridimensional (3D) foi predita utilizando ferramentas de bioinformática. A possível proteína codificada pelo gene *AP2* nos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2 está apresentada na Figura 17.

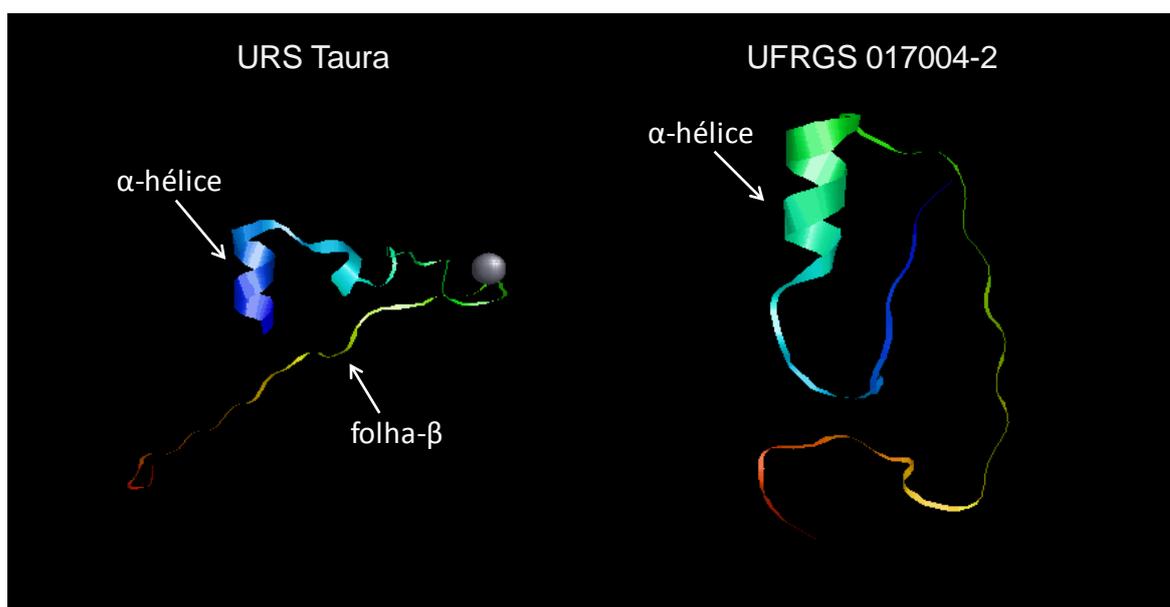


FIGURA 17. Estrutura tridimensional (3D) da possível proteína codificada pelo gene *AP2* nos genitores URS Taura (espiguetas normais) e UFRGS 017004-2 (espiguetas multiflora). A esfera cinza na estrutura do genitor URS Taura representa um íon de Ca^{+2} .

A estrutura 3D da proteína codificada pelos genitores apresenta motivos estruturais distintos. A proteína do genitor URS Taura apresenta um domínio $\alpha+\beta$, onde estruturas folhas- β e α -hélice apresentam-se separadas e definidas. Além disso, a estrutura 3D da proteína deste genitor apresenta um monômero de Ca^{+2} associado à sua estrutura. A proteína referente ao genitor UFRGS 017004-2 apresenta apenas um domínio α , composto por uma α -hélice (Figura 17).

A sequência “y”, identificada nos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2, está apresentada na Figura 18. Da mesma forma que a sequência “x”, esta

de *Brachypodium distachyon* e de trigo que apresentaram similaridade neste alinhamento foram as sequências originais utilizadas para o desenvolvimento do par de *primers* Ap2.7 (Figura 18).

4.3.3 AGAMOUS-LIKE6

A combinação de *primers* AGL6 amplificou uma sequência similar ao gene *AGL6* de outras espécies, em cada um dos genitores estudados. O tamanho de fragmento observado no genitor URS Taura foi de 441 pb, enquanto no genitor UFRGS 017004-2 foi de 440 pb (Figura 19). As sequências identificadas nestes genitores apresentaram similaridade com sequências do gene *AGL6* de aveia branca, aveia preta, cevada, *Brachypodium distachyon*, *Triticum monococcum* e *Lolium temulentum* (Figura 19).

As sequências do gene *AGL6* clonadas em aveia são muito distintas entre os genitores analisados. O genitor UFRGS 017004-2 possui uma série de deleções e inserções quando comparado com outras espécies de gramíneas ou outros genótipos de aveia. Nas posições 39-42, 56, 198-199, 375-388 e 442 verifica-se a ausência de nucleotídeos em relação às outras sequências. Entre as posições 88-91, 241-244, 287-289, e 414-415 foi possível identificar a inserção de nucleotídeos (Figura 19).

No genitor URS Taura também verificou-se algumas deleções em relação a outras espécies, como nas posições 32, 67, 82-83, 121, 198-203 e 287-290. A inserção de quatro nucleotídeos na posição 241-244 também ocorreu na sequência do gene *AGL6* do genitor URS Taura. Além desta inserção, também foi verificado a adição de um nucleotídeo nas posições 342 e 414 no genitor URS Taura (Figura 19).

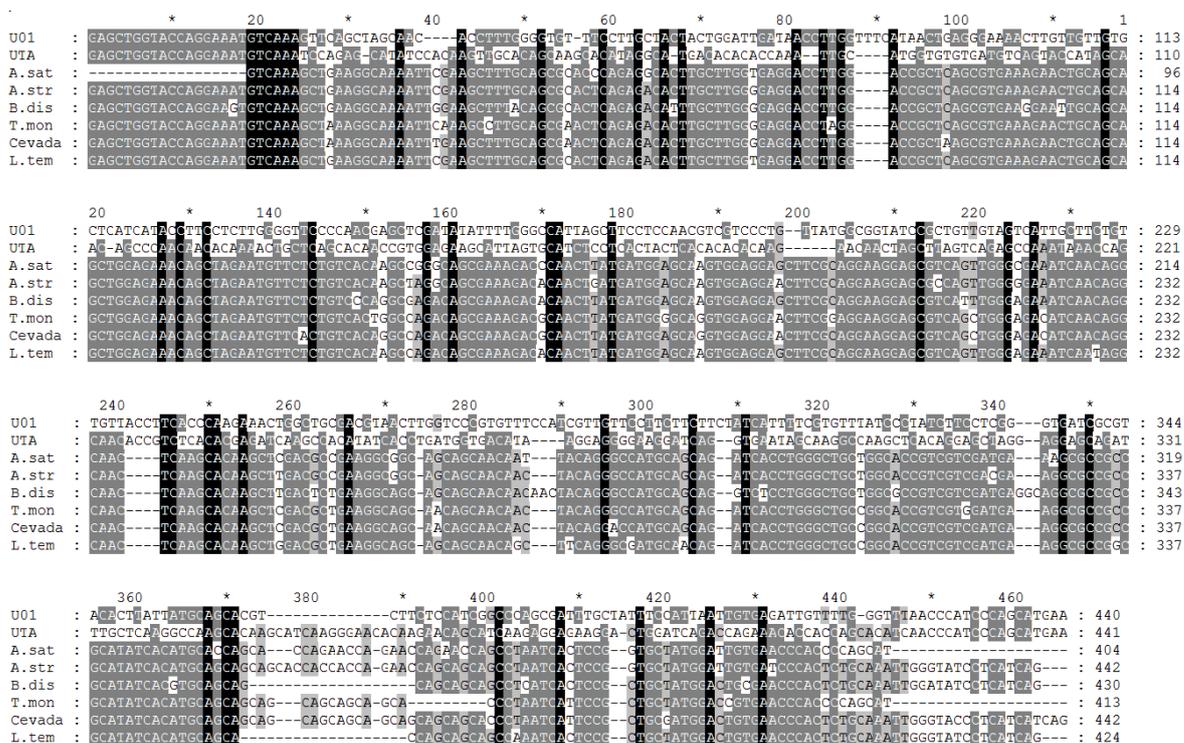


FIGURA 19. Alinhamento de sequências amplificadas neste estudo pelo par de primers AGL6 entre as espécies: aveia branca (A.sat, acesso GQ496645.1), aveia preta (A.str, acesso GQ496644.1), *Brachypodium distachyon* (B.dis, acesso GQ496641.1), *Triticum monococcum* (T.mon, acesso GQ496643.1), cevada (acessos GQ496642.1) e *Lolium temulentum* (L.tem, acesso GQ496646.1). Regiões marcadas em preto e em cinza indicam conservação entre as sequências. Legenda: U01 = sequência do genitor UFRGS 017004-2 e UTA = sequência do genitor URS Taura.

Para identificar se a ocorrência destes polimorfismos alterou a sequência de aminoácidos de cada genitor, as sequências de nucleotídeos foram convertidas em sequências de aminoácidos e comparadas com a sequência completa de aminoácidos do gene *AGL6* de cevada. Estes resultados estão apresentados na Figura 20.

A sequência codificante do gene *AGL6* em cevada possui 789 nucleotídeos, correspondendo a 263 aminoácidos. Os fragmentos clonados nos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2 correspondem a 441 e 440 nucleotídeos, respectivamente. Após realizar a conversão das sequências de nucleotídeos clonadas para sequências de aminoácidos, verificou-se que o

fragmento clonado em aveia está localizado em uma região intermediária da sequência completa de cevada (Figura 20).

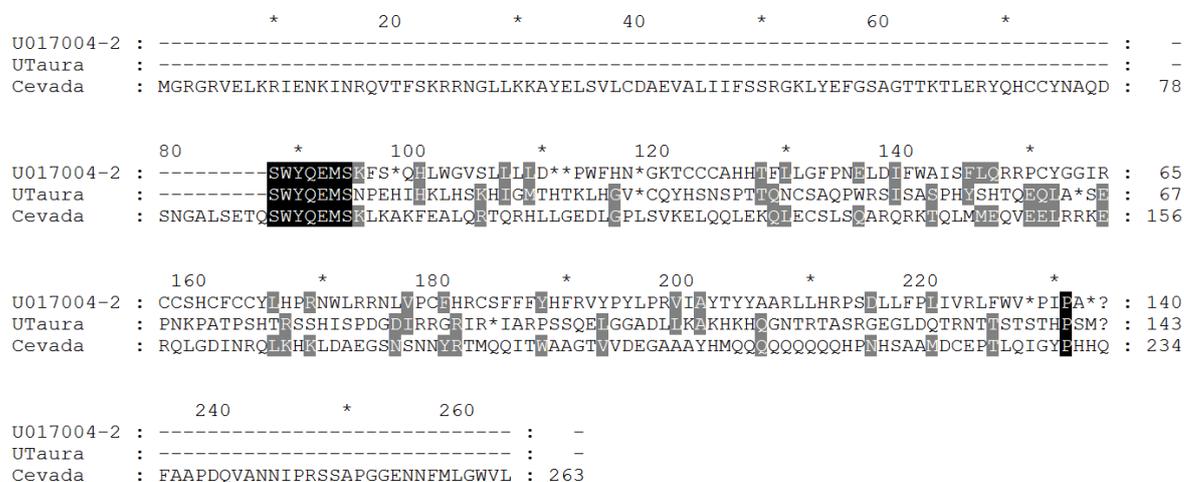


FIGURA 20. Alinhamento da sequência de aminoácidos codificada pelo gene *AGL6* nos genótipos URS Taura e UFRGS 017004-2 com a sequência completa de aminoácidos do gene *AGL6* de cevada (acesso AY541067.1). Regiões marcadas em preto indicaram similaridade entre as sequências de aminoácidos. A presença do asterisco entre os aminoácidos indica a existência de códons de terminação.

Os primeiros sete (URS Taura) ou oito (UFRGS 017004-2) aminoácidos das sequências de aveia são idênticos à sequência de aminoácidos de cevada (Figura 20). No entanto, a partir do códon formado na posição 95, as sequências de aminoácidos de aveia tornam-se completamente distintas (Figura 20). O genitor URS Taura possui uma sequência de 30 aminoácidos até a presença do códon de terminação UGA (Opala), na posição 118. No genitor UFRGS 017004-2, este mesmo códon de terminação está presente na posição 98, permitindo a síntese de apenas 10 aminoácidos (Figura 20).

5 DISCUSSÃO

As populações de linhagens de aveia “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1” e “URS Taura x UFRGS 017004-2” apresentaram desempenho similar para o caráter espiguetas multiflora, nas duas épocas de semeadura em que foram avaliadas. Na segunda época de semeadura, um aumento no número de espiguetas multiflora foi observado, independente da população e do terço da panícula avaliado (Figura 6 e Figura 8). Este aumento no número de espiguetas multiflora pode estar associado às condições ambientais distintas observadas entre as épocas de semeadura.

Na segunda época de semeadura, temperaturas máximas diárias superiores foram registradas. Além disso, o comprimento do dia e/ou fotoperíodo também foi superior nesta época de semeadura. Condições ambientais de elevada temperatura e fotoperíodo longo são, geralmente, indutivas ao florescimento em aveia. Neste estudo, o número de dias da emergência ao florescimento pleno (NDEF) na segunda época de semeadura foi inferior ao NDEF observado na primeira época de semeadura, para a maioria das linhagens avaliadas, em ambas as populações (dados não apresentados). No entanto, não houve efeito significativo da interação genótipo x época de semeadura para o caráter florescimento. Ainda, não foi observada correlação significativa entre os caracteres florescimento e espiguetas multiflora nas populações avaliadas (dados não apresentados).

Todavia, as condições ambientais de elevada temperatura e maior comprimento do dia observadas na segunda época de semeadura, reduziram a instabilidade da expressão do caráter espiguetas multiflora nas populações avaliadas. Isto pode ser demonstrado pelo maior número de linhagens que exibiram o fenótipo 100% das espiguetas multiflora nos três terços avaliados nesta época de semeadura (Figura 6 e Figura 8). A expressividade variável do caráter espiguetas multiflora em aveia, observada em diferentes níveis, entre indivíduos com um mesmo genótipo e entre e dentro de panículas de um mesmo indivíduo, também ocorre em genótipos de arroz. Em arroz, a expressividade variável de mutantes *fickle spikelet1 (fsp1)* é diretamente influenciada pelos estímulos ambientais, principalmente da temperatura. Mutantes *fsp1* são caracterizados por aumentar o número de órgãos florais nas espiguetas (Suzuki *et al.*, 2015).

Embora, estudos relacionando o efeito da temperatura sobre a ocorrência de espiguetas multiflora em aveia sejam escassos na literatura, a associação deste sinal ambiental sobre a formação de grãos nus (caráter nuda) já foi verificada. Avaliando oito genótipos de aveia nuda, em três condições de temperatura (15°C, 20°C e 25°C), Lawes & Boland (1974) identificaram que a formação de grãos nus foi maior na temperatura de 25°C. Neste mesmo trabalho, os autores validaram os resultados em condições de campo, onde a elevada formação de grãos nus esteve associada com a semeadura tardia dos genótipos com expressão do caráter nuda.

Os fatores genéticos responsáveis pela determinação das espiguetas multiflora em aveia, embora não estejam completamente elucidados, atuam em resposta às variações de temperatura, assim como ocorre com o caráter nuda. Nestas condições, possivelmente o meristema das espiguetas não é “desligado”,

o que proporciona a formação de um grande número de flósculos em uma mesma espiguetas. Resultados similares envolvendo o efeito significativo da interação genótipo x época de semeadura, bem como o efeito simples da temperatura, foram identificados em genótipos tetraploides e hexaploides de trigo com espiguetas multiflora (Pennell & Halloran, 1984).

Além da temperatura, outros sinais ambientais devem atuar na formação de espiguetas multiflora em aveia. Ao estudar dez cultivares de aveia em Cambridge, no Reino Unido, em cinco épocas de semeadura (fevereiro a junho), Jenkins (1973) identificou que a expressão do caráter espiguetas multiflora é genótipo-específica e varia em função do fotoperíodo. A maioria dos genótipos avaliados maximizou a expressão do caráter espiguetas multiflora no mês de abril, embora algumas cultivares tenham otimizado a expressão do caráter nos meses de fevereiro e junho (Jenkins, 1973). Estes resultados reafirmam a forte interação genótipo x época de semeadura para o caráter espiguetas multiflora, corroborando com os resultados apresentados neste estudo. Além da temperatura e do fotoperíodo, a interação destes fatores com outros sinais ambientais também pode estar envolvida na formação de espiguetas multiflora em aveia.

Os genitores UFRGS 006013-1 e UFRGS 017004-2 apresentaram respostas diferenciadas em relação às variações ambientais ocorridas durante a condução dos experimentos. Nas duas épocas de semeadura avaliadas, estes genitores apresentaram expressão variável e expressão completa para o caráter espiguetas multiflora, respectivamente. O genitor UFRGS 006013-1 aumentou a formação de espiguetas multiflora e reduziu a formação de espiguetas mosaico na segunda época de semeadura (Tabela 7). Estes resultados sugerem que condições de temperatura e fotoperíodo maiores promoveram a estabilidade deste genitor para o caráter espiguetas multiflora, na segunda época de

semeadura. Por outro lado, o genitor UFRGS 017004-2 apresentou aproximadamente 100% das espiguetas multiflora em ambas as épocas de semeadura, não sendo influenciado pelas condições do ambiente (Tabela 8).

Considerando as diferenças de estabilidade entre os genitores UFRGS 006013-1 e UFRGS 017004-2 quando avaliados nas mesmas condições, as variações ambientais ocorridas não foram suficientes para explicar as causas da variação fenotípica observada entre os genitores para o caráter espiguetas multiflora. Portanto, estes genitores devem apresentar uma constituição genética diferenciada para genes chave no controle do caráter espiguetas multiflora, bem como para outros possíveis fatores genéticos ou epigenéticos que regulam a expressão destes genes.

Ao analisar a genealogia dos genitores UFRGS 006013-1 e UFRGS 017004-2 na Tabela 1, verifica-se que estes possuem o mesmo parental com espiguetas multiflora 'Cocker 492/Starter-1 F₃'. Isto sugere que os demais fatores genéticos ou epigenéticos que podem interferir na expressão do caráter espiguetas multiflora, foram herdados a partir dos genitores com espiguetas normais UFRGS 10 e UFRGS 8. O desenvolvimento e a avaliação de uma população a partir do cruzamento entre os genitores UFRGS 006013-1 x UFRGS 017004-2 poderia fornecer informações importantes sobre o padrão de segregação do caráter espiguetas multiflora e, desta forma, contribuir para a maior compreensão das variações observadas entre estes genitores.

A análise genética indicou que, independente da população de linhagens e da época de semeadura, um gene maior controla o caráter espiguetas multiflora em aveia (Tabela 9 e Tabela 10). Com base no modelo genético de um gene e da geração de autofecundação (F_{5:7}), linhagens que possuem a combinação alélica em homozigose dominante deveriam apresentar a formação do fenótipo 100%

das espiguetas multiflora. Já as linhagens com a presença de alelos em homozigose recessiva deveriam apresentar a formação do fenótipo 100% das espiguetas normais. Os resultados observados identificaram que aproximadamente 50% dos indivíduos apresentaram o fenótipo 100% das espiguetas normais, independente da população e da época de semeadura. Por outro lado, o fenótipo espiguetas mosaico (com número variável de flósculos, com grãos com e sem casca) foi observado entre as linhagens que deveriam produzir o fenótipo 100% das espiguetas multiflora.

Diversos fatores podem estar associados com a formação do fenótipo espiguetas mosaico. Entre eles pode-se citar: i) a expressão variável dos alelos para este loco gênico, que pode ser regulada pelos sinais ambientais, como a temperatura, ou por fatores de transcrição específicos ao gene; ii) variações alélicas dos genes que controlam o caráter espiguetas multiflora, provenientes dos diferentes subgenomas da aveia hexaploide; iii) os genes que controlam o caráter espiguetas multiflora em aveia podem estar localizados em uma das extremidades do cromossomo (região telomérica), dificultando a sua expressão; iv) a ausência de alelos necessários para a expressão completa do caráter em genótipos instáveis e, vi) mecanismos epigenéticos atuando na regulação da expressão gênica, como a ação de microRNAs.

As populações genéticas avaliadas no presente estudo também foram avaliadas em um estudo anterior nas gerações F_5 e $F_{5:6}$. Para a população “UFRGS 01B7114-1-3 x UFRGS 006013-1”, Pellizzaro (2014) atribuiu o controle genético do caráter espiguetas multiflora a um único gene. Estes resultados corroboraram com os resultados obtidos no presente estudo. Por outro lado, foi determinada a ação de dois genes governando o caráter espiguetas multiflora na população “URS Taura x UFRGS 017004-2” (Pellizzaro, 2014). De acordo com

este mesmo autor, a origem do segundo gene nesta população não foi identificada com base na genealogia dos genitores, sendo que estudos complementares seriam necessários para validar a presença e a ação dos dois genes controlando o caráter espiguetas multiflora. No presente estudo, a análise genética do caráter espiguetas multiflora na população “URS Taura x UFRGS 017004-2” divergiu dos resultados de Pellizzaro (2014).

Em populações segregantes de aveia formadas a partir do cruzamento de genótipos Norte Americanos e Australianos (com espiguetas multiflora) com genótipos brasileiros (com espiguetas normais), a herança genética do caráter espiguetas multiflora foi atribuída a um único gene (Cabral *et al.*, 2000). Estes mesmos autores sugerem que este gene possui dominância incompleta. Estudando uma população segregante de aveia, obtida a partir do cruzamento entre as linhagens UFRGS 995080-1 (com espiguetas multiflora) e UFRGS 970486-3 (com espiguetas normais), Brenner (2007) também concluiu que a formação de espiguetas multiflora é determinada por um único gene, sendo que o mesmo deve estar ligado aos genes responsáveis pelo caráter nuda.

Estudos citológicos em estádios iniciais do desenvolvimento das espiguetas demonstram que mesmo em genótipos com espiguetas normais, seis primórdios florais são iniciados. No entanto, apenas dois ou três flósculos basais das espiguetas serão férteis e irão desenvolver grãos (Bonnett, 1966). Isto significa que nos estádios iniciais de desenvolvimento da panícula todos os genótipos apresentam o potencial para desenvolver espiguetas multiflora. A definição se a espiguetas será normal ou multiflora deve estar sobre o controle genético, o que determina a formação ou não de flósculos em regiões superiores das espiguetas (Valentine, 1995).

Vários genes são candidatos ao controle do caráter espiguetas multiflora em aveia, entre eles *Vrn1*, *AP2* e *AGL6*. Estes genes fazem parte do modelo “ABCDE” de florescimento, sendo classificados de acordo com as suas funções em “A”, “A” e “E”, respectivamente (Coen & Meyerowitz, 1991; Theissen *et al.*, 2000; Zahn *et al.* 2005). Entre as suas principais funções estão a determinação das estruturas florais e a especificação da identidade dos meristemas (Mandel *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 2013).

A ocorrência de um SNP na sequência “b” do gene *Vrn1* no genitor URS Taura alterou a sequência de aminoácidos correspondente (Figura 13). Este polimorfismo sugere que o gene *Vrn1* pode controlar a formação de espiguetas multiflora em aveia, uma vez que o genitor UFRGS 017004-2 possui uma sequência de aminoácidos distinta tanto de URS Taura quanto de trigo. Assim como o genitor URS Taura, o genótipo de trigo não apresenta vários antécios em uma mesma espiguetas.

A clonagem e o sequenciamento do gene *Vrn1* já foi realizada em outros genótipos brasileiros de aveia, como UFRGS 8 e UFRGS 881971 (Nava *et al.*, 2012; Barros, 2015). Estes dois genótipos apresentam espiguetas normais e são contrastantes para o caráter florescimento. Ao comparar estes dois genótipos com URS Taura, foi possível observar que não há alteração na sequência de aminoácidos para o quarto éxon do gene *Vrn1*. Neste éxon, é importante ressaltar que foi identificado a alteração de um aminoácido na sequência “b” entre os genitores URS Taura e UFRGS 017004-2. Assim, os resultados reforçam que a alteração de um ácido aspártico na sequência de aminoácidos no genitor UFRGS 017004-2 por um ácido glutâmico no genitor URS Taura, pode estar associada com a expressão do caráter espiguetas multiflora em aveia.

Outro gene candidato ao controle do caráter espiguetas multiflora em aveia é o gene *AP2*. Sequências deste gene em aveia não estão disponíveis na literatura até o momento. No presente estudo, duas sequências de aveia candidatas ao gene *AP2* foram clonadas e sequenciadas. A sequência “x”, presente nos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2, apresenta parte de uma possível ORF (Figura 15). Quando traduzida, esta ORF apresentou 81,2% de similaridade entre os genitores (Figura 16). A diferença na sequência de aminoácidos dos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2 indicou uma estrutura tridimensional (3D) distinta nas proteínas preditas entre eles (Figura 17).

A identificação de uma estrutura protéica diferenciada entre os genitores URS Taura e UFRGS 017004-2 pode ser determinante para elucidar o caráter espiguetas multiflora, pois a função biológica de uma proteína está diretamente associada com a sua estrutura 3D (Griffiths *et al.*, 2000). A ocorrência de um códon de terminação prematuro no genitor UFRGS 017004-2, que faz com que a sua proteína seja truncada, pode restringir a funcionalidade do gene *AP2*. Com isso, é provável que o produto gênico sintetizado neste genitor não tenha a capacidade de restringir o desenvolvimento do meristema das espiguetas. Esta modificação pode restringir a interação entre os produtos dos genes *AP2* e *AG*, resultando em um fenótipo com espiguetas multiflora similar aos mutantes *ag* em *Arabidopsis* (Yanofsky *et al.*, 1990).

Em mutantes *more spikelets1* (*mos1*), um gene de *Brachypodium distachyon* ortólogo ao gene *AP2* de *Arabidopsis*, alterações expressivas no meristema das espiguetas foram identificadas, resultando na formação de espiguetas multiflora (Derbyshire & Byrne, 2013). Considerando que o gene *MOS1* é responsável pela determinação ou repressão dos meristemas que

produzem espiguetas multiflora em *Brachypodium distachyon*, esta mesma ação do gene *AP2* em aveia não pode ser descartada.

Os genes da família *AP2* participam em diversas etapas do desenvolvimento das gramíneas, entre elas: i) a determinação da morfologia das inflorescências, através do controle na transição do meristema das espiguetas para o meristema floral; ii) o desenvolvimento dos órgãos florais e, iii) a resposta a estresses (Kim *et al.*, 2006; Mizoi *et al.*, 2012; Zhang & Yuan, 2014). Estudos recentes demonstraram que os genes *AP2* tem a sua expressão alterada em resposta às variações ambientais. Em *Arabidopsis*, os produtos formados pelo gene *CONSTANS (CO)*, que responde aos estímulos do fotoperíodo, interagem com genes da família *AP2* (Zhang *et al.*, 2015). Neste sentido, as variações fenotípicas observadas para o caráter espiguetas multiflora, nas linhagens avaliadas em diferentes épocas de semeadura neste estudo, podem estar associadas aos níveis variáveis de expressão de genes da família *AP2*.

Outro fator que pode determinar a funcionalidade do gene *AP2* é a sua regulação pós-transcricional exercida pelo *miR172*. A sequência do *miR172a* de *Brachypodium distachyon* apresentou similaridade com a sequência “x” do gene *AP2* (convertidas para RNA mensageiro) em aveia (Figura 15). Considerando que o *miR172* é altamente conservado em um grande número de espécies vegetais (Axtell & Bartel, 2005), este pode ser um mecanismo epigenético que determinou a expressividade variável do caráter espiguetas multiflora em aveia.

As condições ambientais ocorridas na segunda época de semeadura devem ter favorecido a expressão do *miR172*, fazendo com que este tenha aumentado a regulação pós-transcricional do gene *AP2*. Desta forma, proteínas *AP2* são produzidas em menor quantidade, resultando em meristemas florais indeterminados. Estes meristemas tornam-se indeterminados devido à ação do

gene *AG*, que deveria ser controlada pelo gene *AP2* nos estádios iniciais do desenvolvimento floral (Bowman *et al.*, 1991; Drews *et al.*, 1991).

O *miR172* e o *microRNA156* (*miR156*) possuem ação antagonista e são expressos em diferentes estádios do desenvolvimento da planta e sob condições ambientais distintas. Em *Arabidopsis*, o *miR156* diminuiu a sua expressão durante o desenvolvimento das plantas (Wu & Poethig, 2006), enquanto o *miR172* aumentou a sua expressão (Aukerman & Sakai, 2003). A expressão destes microRNAs também foi associada diretamente com a temperatura. Ao estudar duas condições de temperatura (16°C e 23°C) sobre a ação destes microRNAs, Lee *et al.* (2010) verificaram um elevado acúmulo de *miR156* na menor condição de temperatura, enquanto o *miR172* apresentou elevado acúmulo na condição de temperatura mais alta. No entanto, estudos envolvendo a ação do *miR172* em espécies de interesse agrônômico, em resposta às variações de temperatura, ainda encontram-se indisponíveis na literatura.

Além de sequências do gene *Vrn1* e de sequências candidatas ao gene *AP2*, uma sequência do gene *AGL6* foi identificada em cada um dos genitores de aveia estudados. As sequências de nucleotídeos do gene *AGL6* no genitor UFRGS 017004-2, em *Brachypodium distachyon* e em *Lolium temulentum* apresentam uma deleção nas posições 375-388, 373-391 e 372-390, respectivamente (Figura 19). Estas deleções podem estar associadas à ocorrência de espiguetas multiflora, uma vez que o genitor UFRGS 017004-2 e as espécies citadas anteriormente apresentam a expressão deste caráter.

A sequência clonada para o gene *AGL6* em URS Taura apresentou maior similaridade com outras sequências de gramíneas quando comparada com a sequência do genitor UFRGS 017004-2 (Figura 19). No entanto, quando as sequências destes dois genitores foram comparadas com a sequência do gene

AGL6 em outro genótipo de aveia, identificada por Reinheimer & Kellogg (2009), verifica-se uma elevada dissimilaridade entre as mesmas. Provavelmente, as sequências clonadas e sequenciadas nos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2 correspondem a um subgenoma distinto em relação à sequência de aveia identificada por Reinheimer & Kellogg (2009). Estas sequências podem corresponder aos subgenomas “AA”, “CC” ou “DD”, ou ainda a subdivisões dentro de um mesmo subgenoma.

A partir da tradução das sequências do gene *AGL6* nos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2, sequências de aminoácidos distintas, com tamanhos de 30 e 10 aminoácidos, respectivamente, até a ocorrência de um códon de terminação foram originadas (Figura 20). As diferenças nas sequências de aminoácidos entre os genitores pode alterar a formação do caráter espiguetas multiflora. Em arroz, o gene *osmads6*, que pertence à família *AGL6*, proporcionou a má formação da pálea, formação de várias glumas ou órgãos mosaico, desenvolvimento anormal de carpelos e a perda de meristemas florais determinados (Li *et al.*, 2010).

A ação do gene *AGL6* sobre o caráter espiguetas multiflora deve ocorrer de forma indireta, pela interação com o produto de outros genes, como *AP2*. Mutações nos genes *IDS1* e *SID1* de milho proporcionaram a repressão dos fatores de transcrição *AG-like* nos órgãos florais, similar com a função de *AP2* em *Arabidopsis* (Chuck *et al.*, 2008). Em arroz, a formação de duplo mutantes para os genes *osmads6-1* e *osmads1-z*, proporcionou alterações mais severas no meristema floral em relação aos mutantes simples *osmads6*, tornando-o ainda mais indeterminado (Li *et al.*, 2010). Neste sentido, considerando a dissimilaridade entre as sequências dos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2 para o gene *AGL6*, o mesmo torna-se um candidato ao controle do caráter

espiguetas multiflora. No entanto, a relação do gene *AGL6* com o caráter espiguetas multiflora em aveia requer estudos complementares para a sua validação.

A formação das estruturas florais envolve um grande número de genes que atuam de forma isolada e/ou conjunta. Sendo assim, alterações em qualquer um dos genes *Vrn1*, *AP2* e *AGL6* podem determinar a formação das espiguetas multiflora em aveia. Os produtos dos genes *AP1* e *AP2* formam complexos entre si e também com domínios protéicos *MADS* dos genes *SEP*, os quais atuam como reguladores transcricionais de genes homeóticos e como cofatores de proteínas homeóticas em *Arabidopsis* (Lohmann & Weigel, 2002; Gregis *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009). Estas informações refletem a complexidade do caráter espiguetas multiflora, o que justifica o número escasso de trabalhos relevantes envolvendo a expressão desta característica.

Este estudo representou um passo importante para a elucidação de como os sinais ambientais contribuem para a expressividade variável do caráter espiguetas multiflora em genótipos brasileiros aveia. As duas populações de linhagens estudadas alteraram a formação de espiguetas multiflora quando semeadas em diferentes épocas de semeadura. É provável que as condições ambientais ocorridas na segunda época de semeadura foram determinantes para aumentar a formação de espiguetas multiflora. Em trabalhos futuros, a condução de experimentos com um número maior de épocas de semeadura, associado ao monitoramento intenso dos parâmetros ambientais em diferentes estádios do desenvolvimento das plantas, será importante para identificar como a expressividade do caráter espiguetas multiflora é definida em aveia.

Os resultados da análise genética sugerem que um gene principal é responsável pela expressão do caráter espiguetas multiflora em aveia. As

informações moleculares indicaram que os genes *Vrn1*, *AP2* e *AGL6* apresentam polimorfismos genéticos em regiões codificantes nos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2. Desta forma, o envolvimento destes genes no controle do caráter espiguetas multiflora em aveia deve ser considerado. A análise molecular também sugeriu que o gene *AP2* está conservado em aveia, sendo que as duas sequências genômicas identificadas neste estudo possivelmente representam diferentes alelos deste gene. Da mesma forma, duas possíveis variações alélicas do gene *Vrn1* foram identificadas nos genitores URS Taura e UFRGS 017004-2.

Este estudo foi pioneiro na identificação e isolamento de sequências de aveia hexaploide associadas a genes candidatos ao controle do caráter espiguetas multiflora. Entre as próximas etapas a serem desenvolvidas em novos estudos, pode-se destacar: i) o desenvolvimento de novos *primers* associados ao gene *AP2* em aveia; ii) o desenvolvimento de novos marcadores moleculares associados aos polimorfismos genéticos identificados no presente estudo, como marcadores *KASP* (*Kompetitive Allele Specific PCR*); iii) incorporar a análise fenotípica e molecular do presente estudo em futuras análises de *QTL* (*Quantitative Trait Loc*); iv) desenvolver estudos envolvendo o sequenciamento das espécies diploides de aveia silvestre, as quais deram origem à aveia cultivada, a fim de validar a origem e as variações alélicas identificadas neste estudo para os genes *Vrn1*, *AP2* e *AGL6*.

6 CONCLUSÕES

A época de semeadura altera a expressão do caráter espiguetas multiflora em genótipos de aveia.

Condições de temperatura e fotoperíodo superiores promovem a formação de espiguetas multiflora e a redução na formação de espiguetas mosaico em aveia.

O fenótipo espiguetas mosaico se manifesta entre linhagens de aveia em gerações avançadas de autofecundação, demonstrando a expressividade variável do caráter espiguetas multiflora.

O caráter espiguetas multiflora é controlado por um gene de grande efeito sobre o fenótipo em aveia.

Duas sequências genômicas candidatas ao gene *AP2* estão presentes nos genótipos de aveia URS Taura e UFRGS 017004-2.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUKERMAN, M. J.; SAKAI, H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2-like* target genes. **Plant Cell**, Rockville, v.15, n.11, p.2730-2741, 2003.
- AXTELL, M. J.; BARTEL, D. P. Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. **Plant Cell**, Rockville, v.17, n.6, p.1658-1673, 2005.
- BARROS, N. C. **Florescimento em aveia hexaploide**: análise fenotípica e molecular. 2015. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.
- BAUM, B. R. et al. An important new diploid *Avena* species discovered on the Canary Islands. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.51, n.1, p.759-762, 1973.
- BECKER, A.; THEISSEN, G. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.29, n.3, p.464-489, 2003.
- BOMMERT, P. et al. Genetics and evolution of inflorescence and flower development in grasses. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v.46, n.1, p.69-78, 2005.
- BONNETT, O. T. Inflorescences of maize, wheat, rye, barley and oats: their initiation and development. **Bulletin of the Illinois Agricultural Experimental Station**, Illinois, v.721, n.1, p.92-105, 1966.
- BOWMAN, J. L. et al. Genetic interactions among floral homeotic genes of arabidopsis. **Development**, Cambridge, v.112, n.1, p.1-20, 1991.
- BURROWS, V. D. Breeding oats for food and feed: conventional and new techniques and materials. In: WEBSTER, F. H. (Ed.). **Oats: chemistry and technology**. Saint Paul: American Association of Cereal Chemists, 1986. p.13-46.
- BRENNER, E. **Genética da distribuição de grãos nuda em panículas de aveia hexaploide (*Avena sativa* L.)**. 2007. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

BROWN, R. H.; BREGITZER, P. A *Ds* insertional mutant of a barley *miR172* gene results in indeterminate spikelet development. **Crop Science**, Madison, v.51, n.4, p.1664-1672, 2011.

CABRAL, C. B. et al. Genetics of naked grain oats in crosses with brazilian genotypes. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.4, p.851-854, 2000.

CAUSIER, B. et al. Floral organ identity: 20 years of ABCs. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, London, v.21, n.1, p.73-79, 2010.

CHEN, X. A microRNA as a translational repressor of *APETALA2* in Arabidopsis flower development. **Science**, Washington, v.303, n.5666, p.2022-2025, 2004.

CHUCK, G. et al. The control of maize spikelet meristem fate by the *APETALA2-like* gene *indeterminate spikelet1*. **Genes & Development**, New York, v.12, n.8, p.1145-1154, 1998.

CHUCK, G. et al. The control of spikelet meristem identity by the *branched silkless1* gene in maize. **Science**, Washington, v.298, n.5596, p.1238-1241, 2002.

CHUCK, G. et al. The heterochronic maize mutant *Corngrass1* results from overexpression of a tandem microRNA. **Nature Genetics**, New York, v.39, n.4, p.544-549, 2007a.

CHUCK, G. et al. The maize *tasselseed4* microRNA controls sex determination and meristem cell fate by targeting *Tasselseed6/indeterminate spikelet1*. **Nature Genetics**, New York, v.39, n.12, p.1517-1521, 2007b.

CHUCK, G. et al. Floral meristem initiation and meristem cell fate are regulated by the maize *AP2* genes *ids1* and *sid1*. **Development**, Cambridge, v.135, n.18, p.3013-3019, 2008.

CIAFFI, M. et al. Molecular aspects of flower development in grasses. **Sexual Plant Reproduction**, Berlin, v.24, n.4, p.247-282, 2011.

COEN, E. S.; MEYEROWITZ, E. M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. **Nature**, London, v.353, n.6339, p.31-37, 1991.

COFFMAN, F. A. **Oat history, identification and classification**. Washington: USDA-ARS, 1977. 356p.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Séries históricas**: Séries Históricas de Área Plantada, Produtividade e Produção, Relativas às Safras 1976/77 a 2014/15 de Grãos, 2001 a 2014 de Café, 2005/06 a 2014/15 de Cana-de-Açúcar. [2015]. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2>>. Acesso em: dez.2015.

CRUZ, C. D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.35, n.3, p.271-276, 2013.

DE MORI, C. et al. Aspectos econômicos e conjunturais da cultura da aveia. Passo Fundo, 2012. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do136.htm. Acesso em: 13 dez. 2015.

DERBYSHIRE, P.; BYRNE, M. E. *MORE SPIKELETS1* is required for spikelet fate in the inflorescence of brachypodium. **Plant Physiology**, Glasgow, v.161, n.3, p.1291-1302, 2013.

DOUST, A. Architectural evolution and its implications for domestication in grasses. **Annals of Botany**, London, v.100, n.5, p.941-950, 2007.

DREWS, G. N. et al. Negative regulation of the Arabidopsis homeotic gene *AGAMOUS* by the *APETALA2* product. **Cell**, Cambridge, v.65, n.6, p.991-1002, 1991.

FAOSTAT. [Base de dados]. Rome: FAO/Statistics Division,[2016].Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>>. Acesso em: Fev.2016.

FAVARO, R. et al. MADS-box protein complexes control carpel and ovule development in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v.15, n.11, p.2603-2611, 2003.

FU, D. et al. Large deletions within the first intron in *Vrn-1* are associated with spring growth habit in barley and wheat. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.273, n.1, p.54-65, 2005.

GREGIS, V. et al. *AGL24*, *SHORT VEGETATIVE PHASE*, and *APETALA1* redundantly control *AGAMOUS* during early stages of flower development in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v.18, n.6, p.1373-1382, 2006.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **An Introduction to Genetic Analysis**. 7.ed. New York: W. H. Freeman, 2000. 860p.

HALL, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, London, v.1, n.41, p.95-98, 1999.

IRISH, V. F.; SUSSEX, M. Function of the *apetala-1* gene during Arabidopsis floral development. **Plant Cell**, Rockville, v.2, n.8, p.741-753, 1990.

JENKINS, G. The effect of sowing date and photoperiod on panicle morphology in naked oats (*Avena nuda*). **Annals of Applied Biology**, London, v.73, n.1, p.85-94, 1973.

JUNG, J. et al. The *GIGANTEA*-regulated *microRNA172* mediates photoperiodic flowering independent of *CONSTANS* in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v.19, n.9, p.2736-2748, 2007.

KELLOGG, E. A. Floral displays: genetic control of grass inflorescences. **Current Opinion in Plant Biology**, Missouri, v.10, n.1, p.26-31, 2007.

KIBITE, S.; TAYLOR, J. S. Inheritance and linkage relationships of genes conditioning hulllessness, multiflorous spikelet, and giantism in oat (*Avena sativa* L.). **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.74, n.1, p.497-500, 1994.

KIM, S. et al. Phylogeny and domain evolution in the *APETALA2-like* gene family. **Molecular Biology and Evolution**, New York, v.23, n.1, p.107-120, 2006.

KLINDWORTH, D. L. et al. Telosomic mapping of four genetic markers in durum wheat. **Journal of Heredity**, Washington, v.88, n.3, p.229-232, 1997.

KOMAKI, M. K. et al. Isolation and characterization of novel mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in flower development. **Development**, Cambridge, v.104, n.2, p.195-203, 1988.

KOMATSU, M. et al. *FRIZZY PANICLE* is required to prevent the formation of axillary meristems and to establish floral meristem identity in rice spikelets. **Development**, Cambridge, v.130, n.16, p.3841-3850, 2003.

LADIZINSKY, G. **Studies in oat evolution: a man's with *Avena***. New York: Springer Briefs in Agriculture, 2012. 87p.

LAWES, D. A.; BOLAND, P. Effect of temperature on the expression of the naked grain character in oats. **Euphytica**, Wageningen, v.23, n.1, p.101-104, 1974.

LEE, D. Y.; AN, G. Two *AP2* family genes, *SUPERNUMERARY BRACT* (*SNB*) and *OsINDETERMINATE SPIKELET1* (*OsIDS1*), synergistically control inflorescence architecture and floral meristem establishment in rice. **Plant Journal**, Oxford, v.69, n.3, p.445-461, 2012.

LEE, D. Y. et al. The rice heterochronic gene *SUPERNUMERARY BRACT* regulates the transition from spikelet meristem to floral meristem. **Plant Journal**, Oxford, v.49, n.1, p.64-78, 2007.

LEE, H. et al. Genetic framework for flowering-time regulation by ambient temperature-responsive miRNAs in *Arabidopsis*. **Nucleic Acids Research**, London, v.38, n.9, p.3081-3093, 2010.

LEFORT, F.; DOUGLAS, C. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. **Annals of Forest Science**, Paris, v.56, n.3, p.259-263, 1999.

LEGGETT, J. M.; THOMAS, H. Oat evolution and cytogenetics. In: WELCH, R. W. (Ed.). **The oat crop: production and utilization**. London: Chapman & Hall, 1995. p.120-149.

LENHARD, M. et al. Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristems by interactions between *WUSCHEL* and *AGAMOUS*. **Cell**, Cambridge, v.105, n.6, p.805-814, 2001.

LI, H. et al. The *AGL6-like* gene *OsMADS6* regulates floral organ and meristem identities in rice. **Cell Research**, Beijing, v.20, n.3, p.299-313, 2010.

- LITT, A.; KRAMER, E. M. The ABC model and the diversification of floral organ identity. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, London, v.21, n.1, p.129-137, 2010.
- LIU, C. et al. Specification of Arabidopsis floral meristem identity by repression of flowering time genes. **Development**, Cambridge, v.134, n.10, p.1901-1910, 2007.
- LIU, C. et al. Regulation of floral patterning by flowering time genes. **Developmental Cell**, Cambridge, v.16, n.5, p.711-722, 2009.
- LODHI, M. A. et al. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and Vitis species. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v.12, n.1, p.6-13, 1994.
- LOHMANN, J. U. et al. A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in Arabidopsis. **Cell**, Cambridge, v.105, n.6, p.793-803, 2001.
- LOHMANN, J. U.; WEIGEL, D. Building beauty: the genetic control of floral patterning. **Developmental Cell**, Cambridge, v.2, n.2, p.135-142, 2002.
- LOSKUTOV, I. G. On evolutionary pathways of Avena species. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v.55, n.1, p.211-220, 2008.
- MANDEL, M. A. et al. Molecular characterization of the Arabidopsis floral homeotic gene *APETALA1*. **Nature**, London, v.360, p.273-277, 1992.
- MIZOI, J. et al. *AP2/ERF* family transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1819, n.2, p.86-96, 2012.
- NAVA, I. C. et al. Tagging and mapping candidate loci for vernalization and flower initiation in hexaploid oat. **Molecular Breeding**, Lleida, v.30, n.3, p.1295-1312, 2012.
- NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS, H. B. J. **GeneDoc**: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. 1997. (Distribuído pelos autores <<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>>).
- OHMORI, S. et al. *MOSAIC FLORAL ORGANS1*, an *AGL6-like* MADS box gene, regulates floral organ identity and meristem fate in rice. **Plant Cell**, Rockville, v.21, n.10, p.3008-3025, 2009.
- OUGHAM, H. J. et al. Morphological and biochemical characterization of spikelet development in naked oats (*Avena sativa*). **New Phytologist**, Bristol, v.134, n.1, p.5-12, 1996.
- PELLIZZARO, K. **Mapeamento genético do caráter nuda em aveia hexaploide**. 2014. 82 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

PELTONEN-SAINIO, P. et al. Characterising strengths, weaknesses, opportunities and threats in producing naked oat as a novel crop for northern growing conditions. **Agricultural and Food Science**, Helsinki, v.13, n.5, p.212-228, 2004.

PENNELL, A. L.; HALLORAN, G. M. Influence of time of sowing, photoperiod, and temperature on supernumerary spikelet expression in wheat. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.62, n.8, p.1687-1692, 1984.

POURSAREBANI, N. et al. The genetic basis of composite spike form in barley and "miracle-wheat". **Genetics**, Berlin, v.201, n.1, p.155-165, 2015.

RAJHATHY, T.; THOMAS, H. Cytogenetics of oats. Ottawa: **Genetics Society of Canada**, 1974. 90p.

REINHEIMER, R.; KELLOGG, E. A. Evolution of *AGL6-like* MADS box genes in grasses (Poaceae): ovule expression is ancient and palea expression is new. **Plant Cell**, Rockville, v.21, n.9, p.2591-2605, 2009.

SAYLE, R. A.; MILLNER-WHITE, E. J. RASMOL: biomolecular graphics for all. **Trends in Biochemical Sciences**, Cambridge, v.20, n.30, p.374-376, 1995.

SCHMIDT, R. J.; AMBROSE, B. A. The blooming of grass flower development. **Current Opinion in Plant Biology**, Missouri, v.1, n.1, p.60-67, 1998.

SHAN, H. et al. Patterns of gene duplication and functional diversification during the evolution of the *AP1/SQUA* subfamily of plant MADS-box genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.44, n.1, p.26-41, 2007.

SIMONS, M. D. et al. **Oats**: a standardized system of nomenclature for genes and chromosomes, and catalog of genes governing characters. Washington: USDA-SEA, 1978. 450p.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Principles of genetics**. 6.ed. Jefferson City: Wiley, 2012. 784p.

STEEL, R. G. D.; TORRIE, J. H. **Principles and procedures of statistics**: a biometrical approach. 2.ed. New York: McGraw-Hill, 1980. 633p.

STRECK, E. V. et al. **Solos do Rio Grande do Sul**. 2.ed. Porto Alegre: EMATER/RS-ASCAR, 2008. 222p.

SUZUKI, C. et al. Analysis of a rice *fickle spikelet1* mutant that displays an increase in flower and spikelet organ number with inconstant expressivity. **Genes & Genetic System**, Otsu, v.90, n.3, p.181-184, 2015.

TAMURA, K. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.30, n.12, p.2725-2729, 2013.

TANAKA, W. et al. Grass meristems II: inflorescence architecture, flower development and meristem fate. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v.54, n.3, p.313-324, 2013.

THEISSEN, G. et al. Classification and phylogeny of the MADS-box multigene family suggest defined roles of MADS-box gene subfamilies in the morphological evolution of eukaryotes. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v.43, n.5, p.484-516, 1996.

THEISSEN, G. et al. A short history of MADS-box genes in plants. **Plant Molecular Biology**, Hague, v.42, n.1, p.115-149, 2000.

THEISSEN, G. Development of floral organ identity: stories from the MADS house. **Current Opinion in Plant Biology**, Missouri, v.4, n.1, p.75-85, 2001.

THOMPSON, B. E.; HAKE, S. Translational biology: from Arabidopsis flowers to grass inflorescence architecture. **Plant Physiology**, Glasgow, v.149, n.1, p.38-45, 2009.

THOMPSON, J. D. et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, London, v.22, n.22, p.4673-4680, 1994.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, London, v.35, n.1, p.W71-W74, 2007.

VALENTINE, J. Naked Oats. In: WELCH, R. W. (Ed.). **The oat crop: production and utilization**. London: Chapman & Hall, 1995. p.505-532.

VAVILOV, N. I. **Origin and geography of cultivated plants**. Cambridge: Cambridge University Press, 1992. 361p.

VEIT, B. et al. Maize floral development: new genes and old mutants. **Plant Cell**, Rockville, v.5, n.10, p.1205-1215, 1993.

VOGEL, J. P. et al. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. **Nature**, London, v.463, n.7282, p.763-768, 2010.

VON ZITZEWITZ, J. et al. Molecular and structural characterization of barley vernalization genes. **Plant Molecular Biology**, Hague, v.59, n.3, p.449-467, 2005.

WOLLMANN, H. et al. On reconciling the interactions between *APETALA2*, *miR172* and *AGAMOUS* with the ABC model of flower development. **Development**, Cambridge, v.137, n.21, p.3633-3642, 2010.

WU, G. et al. The sequential action of *miR156* and *miR172* regulates developmental timing in Arabidopsis. **Cell**, Cambridge, v.138, n.4, p.750-759, 2009.

WU, G.; POETHIG, R. S. Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by *miR156* and its target *SPL3*. **Development**, Cambridge, v.133, n.18, p.3539-3547, 2006.

YAN, L. et al. Positional cloning of the wheat vernalization gene *Vrn1*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v.100, n.10, p.6263-6268, 2003.

YANOFSKY, M. F. et al. The protein encoded by the Arabidopsis homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. **Nature**, London, v.346, n.6279, p.35-39, 1990.

ZAHN, L. M. et al. The evolution of the *SEPALLATA* subfamily of MADS-box genes: a preangiosperm origin with multiple duplications throughout angiosperm history. **Genetics**, Berlin, v.169, n.4, p.2209-2223, 2005.

ZHANG, B. et al. Arabidopsis *TOE* proteins convey a photoperiodic signal to antagonize *CONSTANS* and regulate flowering time. **Genes & Development**, New York, v.29, n.9, p.975-987, 2015.

ZHANG, D.; YUAN, Z. Molecular control of grass inflorescence development. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.65, n.1, p.553-578, 2014.

ZHAO, L. et al. *miR172* regulates stem cell fate and defines the inner boundary of *APETALA3* and *PISTILLATA* expression domain in Arabidopsis floral meristems. **Plant Journal**, Oxford, v.51, n.5, p.840-849, 2007.

ZHU, Q. et al. Over-expression of *miR172* causes loss of spikelet determinacy and floral organ abnormalities in rice (*Oryza sativa*). **BMC Plant Biology**, London, v.9, n.149, p.1-13, 2009.